

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON

pour obtenir

LE DIPLOME DE DOCTEUR DE SPECIALITE (3^e CYCLE)

DE CHIMIE (BIOCHIMIE)

PAR

Monique ARPIN

**Effet de certains cations sur la conformation
et la teneur
en RNA 5 S des grosses sous-unités ribosomiques
de foie de rat**

Soutenue le 30 Juin 1972, devant la Commission d'Examen.

M^{lle} D. GAUTHERON ... Président

MM. J. DAILLIE }
J.-P. REBOUD } Examineurs

LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

—
1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552607_0005

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON

pour obtenir

LE DIPLOME DE DOCTEUR DE SPECIALITE (3^e CYCLE)

DE CHIMIE (BIOCHIMIE)

PAR

Monique ARPIN

**Effet de certains cations sur la conformation
et la teneur
en RNA 5 S des grosses sous-unités ribosomiques
de foie de rat**

Soutenue le 30 Juin 1972, devant la Commission d'Examen.

M^{lle} D. GAUTHERON ... Président

MM. J. DAILLIE }
J.-P. REBOUD } Examineurs

LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

—
1972

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

LYON

Président : M. le Professeur J. BOIDIN

1er Vice-Président : M. R. TOURAINE, Maître de Conférences agrégé.

2ème Vice-Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant.

3ème Vice-Président : M. D. SETTELEN, Etudiant.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

UNITES

DIRECTEURS

U.E.R. Médicale Grange-Blanche	M.le Professeur D. GERMAIN
U.E.R. Médicale Alexis-Carrel	M.le Professeur C. GIROD
U.E.R. Médicale LYON-Nord	M.le Professeur A. BERTOYE
U.E.R. Médicale LYON-Sud-Ouest	M.le Professeur L. TOLOT
U.E.R. des Sciences pharmaceutiques	M.M. CARRAZ, Maître de Conférences agrégé.
U.E.R. des Techniques de Réadaptation	M.le Professeur P.MOUNIER-KUHN
U.E.R. de Biologie Humaine	M. J.C. CZYBA, Maître de Conférences agrégé.
U.E.R. d'Education Physique et Sportive	M. A.MILLON, Professeur E.P.S.
U.E.R. des Sciences Odontologiques	M. R.VINCENT
U.E.R. de Mathématiques	M.le Doyen J. BRACONNIER
U.E.R. de Physique	M.le Professeur M. DUFAY
U.E.R. de Chimie et Biochimie	M.le. le Professeur D.GAUTHERON
U.E.R. des Sciences de la Nature	M.le Professeur L.DAVID
U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie	M.le Professeur R. FONTANGES
U.E.R. de Physique nucléaire	M.le Professeur A. SARAZIN
U.E.R. de Mécanique	M.le Professeur J. MATHIEU
Observatoire	M.le Professeur J.H. BIGAY
Institut Universitaire de Technologie 1	M.le Professeur B. POUYET
Institut Universitaire de Technologie 2	M. J.GALLET

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE

EFFET DE CERTAINS CATIONS SUR LA CONFORMATION
ET LA TENEUR EN RNA 5S DES GROSSES SOUS-UNITES
RIBOSOMIQUES DE FOIE DE RAT.

Ce travail expose les recherches effectuées dans le Laboratoire de Biochimie Médicale de l'Unité Lyon-Nord, de Monsieur le Professeur J. BERTRAND ; nous le remercions de nous avoir acceptée comme assistante.

Mademoiselle le Professeur D. GAUTHERON, après nous avoir enseigné la Biochimie, a bien voulu présider notre jury de thèse ; nous lui en sommes profondément reconnaissante.

Nous exprimons notre plus entière reconnaissance à Monsieur J.P. REBOUD, Maître de Conférences Agrégé de Biochimie, pour l'intérêt constant porté à notre recherche ; ses conseils et ses encouragements nous furent précieux.

A Madame A.M. REBOUD, Chargée de Recherche au C.N.R.S., nous voulons dire notre profonde gratitude. Grâce à son enthousiasme, sa sollicitude constante et sa grande connaissance du sujet nous nous sommes très rapidement trouvée au coeur des problèmes posés par la structure des ribosomes et de ce fait, intéressée dans notre travail. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de nos plus sincères remerciements.

Nous remercions Monsieur J. DAILLIE, Maître de Conférences, d'avoir bien voulu juger notre travail.

Pour l'amitié ou l'aide apportée au cours de ce travail, nous remercions enfin tous nos collègues de Laboratoire.

LISTE DES ABREVIATIONS

RNA : acide ribonucléique

rRNA: RNA ribosomique

tRNA: RNA de transfert

mRNA: RNA messenger

poly U : acide polyuridylique

RNase : ribonucléase

DOC : désoxycholate de sodium

SDS : dodécyl sulfate de sodium

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

PVS : polyvinyl sulfate de potassium

TRIS : Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane

TCA : acide trichloracétique

q.s.p.: quantité suffisante pour...

TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène diamine

INTRODUCTION

=====

INTRODUCTION

Les ribosomes de foie de rat , traités par les sels de divers cations monovalents, se dissocient en leurs deux sous-unités constitutives (1). Les deux sous-unités peuvent être ensuite séparées (2): les petites sous-unités sont obtenues complètement pures, les grosses sous-unités ne sont que très faiblement contaminées par les petites.

Les propriétés de ces sous-unités varient suivant la nature et la concentration des sels utilisés pour les préparer. Ainsi, les sous-unités obtenues avec KCl, RbCl, NH_4Cl 0,3-0,5M et NaCl 0,3M sont réassociables en monosomes par dialyse contre un tampon riche en Mg^{++} et sont actives au cours de la synthèse de polyphénylalanine en présence de poly U. Par contre, les sous-unités préparées avec NaCl 0,5M ou avec LiCl et CsCl 0,3-0,5M ne se réassocient pas et sont inactives. Des expériences de croisements entre des grosses et des petites sous-unités préparées avec des sels différents permettent de préciser que le LiCl et le CsCl, à la concentration de 0,3M, modifient sélectivement les grosses sous-unités, qui ne peuvent plus se réassocier aux petites sous-unités et sont inactives. Les petites sous-unités obtenues dans les mêmes conditions peuvent se réassocier à des grosses sous-unités standard (obtenues avec des cations tels que K^+ , Rb^+ , NH_4^+) pour former des ribosomes actifs.

L'inactivation des grosses sous-unités par le LiCl et le CsCl est accompagnée d'une modification importante de leur coefficient de sédimentation (environ 50S au lieu de 60S). La densité de ces grosses sous-unités étant pratiquement identique à celle des sous-unités standard, on ne peut expliquer l'abaissement du coefficient

de sédimentation par une déprotéinisation importante des sous-unités sous l'action de ces deux cations (3). Nous avons donc pensé que le Li^+ et le Cs^+ pouvaient modifier la conformation des sous-unités, en leur donnant une forme moins compacte, ce qui expliquerait la valeur anormalement basse de leur coefficient de sédimentation, et aussi vraisemblablement l'incapacité de ces sous-unités à se réassocier aux 40S.

Dans ce travail, nous avons étudié directement les modifications structurales des sous-unités 60S produites par le Li^+ et le Cs^+ . La technique utilisée consiste à examiner l'effet de ces cations sur la quantité et la nature des protéines accessibles à un réactif, le bleu procion, qui forme avec les groupements aminés libres, amides et hydroxyles des liaisons covalentes (4). Nous avons observé que si la plupart des protéines des sous-unités 60S standard sont protégées contre l'action du bleu procion, plusieurs sont accessibles au réactif dans les sous-unités obtenues après traitement des ribosomes par le LiCl et CsCl . Ceci démontre que ces deux cations produisent une profonde altération de la structure des grosses sous-unités.

On sait d'autre part que les sous-unités mises en présence d'EDTA, chélatant les ions Mg^{++} , prennent aussi une conformation moins compacte (5). Ce changement de conformation s'accompagne de la libération des molécules de RNA 5S présentes dans les grosses sous-unités. Ceci nous a amenée à rechercher si dans nos conditions, les cations qui modifient la conformation des grosses sous-unités libéreraient aussi le RNA 5S.

Nous résumerons d'abord dans un exposé bibliographique les principales données concernant la structure des ribosomes de bactéries et de cellules eucaryotes et l'influence des sels monocationiques sur ces ribosomes. Nous exposerons ensuite les méthodes utilisées dans ce travail , puis nous envisagerons successivement les résultats obtenus concernant d'une part, les modifications de conformation des grosses sous-unités ribosomiques préparées avec différents sels, et d'autre part, la teneur en RNA 5S de ces sous-unités.

CHAPITRE I

STRUCTURE DES RIBOSOMES

1-1. Tableau récapitulatif des principales caractéristiques physiques des ribosomes.

Les caractéristiques physiques (constante de sédimentation et poids moléculaire) des différents constituants ribosomiques de mammifères et de bactéries sont consignés dans le tableau I.

Dans le cas des sous-unités de ribosomes de mammifères, les valeurs obtenues diffèrent quelque peu selon la méthode de préparation de ces sous-unités (6) : les grosses sous-unités actives obtenues en traitant les ribosomes par de l'urée, et inactives préparées par action de l'EDTA sur les ribosomes ont sensiblement le même poids moléculaire et le même pourcentage de protéines. Les petites sous-unités actives ont un poids moléculaire et un pourcentage de protéines plus élevés que les sous-unités inactives qui ont perdu des protéines. Cependant, la quantité de protéines dissociée est faible puisque la densité des sous-unités préparées avec l'EDTA n'augmente pas.

1-2. Les RNA ribosomiques : propriétés et rôle

1-2-1. Chez les bactéries

Comme l'indique le tableau I, les ribosomes bactériens sont formés de deux RNA de haut poids moléculaire, de constante de sédimentation 16S et 23S respectivement. Ces RNA

TABLEAU I

Caractéristiques physiques des ribosomes de mammifères et de bactéries

Les caractéristiques physiques des sous-unités actives obtenues par dissociation des ribosomes de foie de rat avec l'urée et des sous-unités inactives préparées à partir de ribosomes traités par l'EDTA sont consignées dans ce tableau (6-54). Les poids moléculaires des sous-unités ont été déterminés par sédimentation à l'équilibre. La composition en protéines est déduite des mesures de densité par centrifugation isopychnique.

	Sous-unités	Coefficient de sédimentation (S)	Poids moléculaire $\times 10^{-6}$ (daltons)	% Protéines	teneur en RNA
Mammifères	Actives (6) (urée)	40,9	1,50	55	18S ($0,7 \times 10^6$)
		59,1	3,00	43	28S ($1,7 \times 10^6$)
					5S (37 000)
	Inactives (7) (EDTA)	28,6	1,18	47	
		49,9	3,12	45	
Bactéries		50	1,8	63	23S ($1,12 \times 10^6$)
					5S (37 000)
		30	0,8	37	16S ($0,56 \times 10^6$)

forment des sites spécifiques sur lesquels se fixent les protéines (8).

La sous-unité 30S contient en outre un rRNA de faible poids moléculaire, de constante de sédimentation 5S. Décrit d'abord chez E. coli, aucun rôle précis n'a encore été déterminé pour ce RNA. L'absence dans le RNA 5S de bases méthylées ou d'acide pseudouridilique présents dans les RNA 16S, 23S et 4S, démontre que ce RNA 5S ne constitue pas un produit de dégradation de ces derniers. En outre, contrairement aux t-RNA, le RNA 5S n'accepte pas les amino-acides (9).

Les expériences réalisées par Forget et Reynier (10) sur les particules ribosomiques reconstituées d'une part, et par Feunteun et Monier (11) sur des sous-unités actives d'autre part, ont montré que l'accessibilité du RNA 5S à la RNase T₁ ou à la RNase pancréatique est nulle. Ces résultats suggèrent que dans les particules reconstituées, préalablement dissociées par LiCl, ainsi que dans les sous-unités 50S actives, le RNA 5S est situé à l'intérieur du ribosome. Le RNA 5S ne jouerait alors aucun rôle à la surface du ribosome, mais interviendrait dans le maintien de la structure de la sous-unité 50S.

Les sous-unités 50S ayant perdu leur RNA 5S sont inactives (12-14), de façon irréversible, de sorte qu'il n'est pas possible de déterminer si cette inactivation est due à l'enlèvement du 5S ou à une désorganisation des particules à la suite du traitement subi.

En utilisant des particules déficientes en protéines, Monnier et coll. (15-17) ont mis en évidence la réassociation spécifique du RNA 5S avec les particules ribosomiques: cependant, les particules reconstituées demeuraient inactives.

Les expériences de reconstitution effectuées récemment à partir des constituants des sous-unités 50S de Bacillus stearothermophilus (18-19) d'une part, et d'E.coli d'autre part (20), ont démontré que le RNA 5S était indispensable pour obtenir des sous-unités 50S actives.

1-2-2. Chez les mammifères

Les rRNA 18S et 28S jouent, comme dans le cas des bactéries, un rôle important dans la structure des ribosomes puisque la localisation de chaque protéine ribosomique est déterminée par la séquence nucléotidique de ces RNA.

La sous-unité 60S contient également du RNA de constante de sédimentation 5S.

La présence d'un second RNA de faible poids moléculaire dans cette sous-unité (21-23) a été décrit dans le cas de ribosomes de cellules eucaryotes. Ce RNA de constante de sédimentation 7S forme un complexe avec le RNA 28S ; formé d'environ 130 nucléotides (24), il peut être détaché du gros RNA par des traitements susceptibles de rompre des liaisons hydrogènes (exposition brève à haute température, traitement par l'urée 5M ou par le diméthylsulfoxyde) sans qu'il y ait rupture de liaisons phosphodiester (21).

King et Gould ont montré que la séparation du RNA 28S et 7S peut être obtenue à relativement basse température (43° dans le tampon phosphate 0,01M à pH = 7,6) (22).

Bien que le rôle de ce RNA 7S ne soit pas encore très clair, la petite différence dans le coefficient de sédimentation du RNA 28S non chauffé et chauffé détectée par Pene et coll. (21), conduit ces auteurs à l'idée que le RNA 7S joue un rôle dans la conformation du RNA 28S : en effet, une différence de 30 à 40 000 daltons entre deux molé-

cules de même forme et de poids moléculaire $1,7 \times 10^6$ ne peut être détectée au cours de la centrifugation zonale.

Pour King et coll. (22) ce RNA 7S se trouverait dans une région du ribosome déficiente en protéines puisqu'aucune protéine n'est liée à ce RNA 7S.

Enfin, il semble intéressant de noter que ce RNA 7S n'a pu être mis en évidence dans les ribosomes d'E.coli (21).

1-3. Les protéines ribosomiques

1-3-1. Chez E.coli

Waller et Harris furent les premiers à démontrer la grande hétérogénéité des protéines ribosomiques d'E.coli (25-26).

De nombreux laboratoires se sont attachés par la suite à isoler, dénombrer et caractériser l'ensemble de ces protéines (27-32).

Au niveau des sous-unités 30S leur nombre n'est pas établi rigoureusement : 19 à 22 pour Craven et coll. (31), 20 pour Traut et coll. (32) et enfin 21 pour Nomura et coll. (33), (19 d'entre ces dernières correspondent d'ailleurs aux protéines purifiées par le groupe de Kurland) (34).

Au niveau des sous-unités 50S, les résultats apparaissent beaucoup plus hétérogènes : si pour Traut et coll. (32) leur nombre oscille entre 34 et 38, pour le groupe de Kurland (34) il est compris entre 25 et 31.

Deux protéines sont identiques dans la grosse sous-unité; les autres protéines ne présentent qu'une seule copie. Si la petite sous-unité contient une seule copie de 7 protéines différentes, le nombre de copies des autres protéines est compris entre 0,2 et 0,8 par ribosome (35). Ces résultats montrent l'hétérogénéité des ribosomes d'E.coli (32-36).

1-3-2. Chez les mammifères

Par comparaison avec les cellules procaryotes, en particulier celles d'E.coli, la composition et les propriétés des protéines ribosomiques de mammifères sont peu connues. Des travaux récents ont montré que le nombre de protéines des ribosomes de cellules eucaryotes est supérieur à celui des cellules procaryotes (37-39).

La grosse sous-unité des ribosomes de réticulocytes de lapin contient 40 à 60 protéines dont le poids moléculaire moyen est de 22 000, les valeurs extrêmes étant 8 000 et 57 000 daltons. La petite sous-unité renferme 30 à 40 protéines dont le poids moléculaire moyen est de 18 000, avec des poids moléculaires extrêmes de 6 000 et 39 000 daltons.

Il semble y avoir de plus quelques différences entre les protéines ribosomiques de divers organes d'une même espèce, alors que des diagrammes identiques sont obtenus à partir de protéines de ribosomes de foie de lapin et de foie de rat (39).

1-4. Organisation des ribosomes

Les sous-unités ribosomiques 30S de bactéries ont pu être reconstruites in vitro à partir de leurs composants moléculaires et ceci pour différentes espèces de bactéries. Traub et coll. (40), Nomura et coll. (41-43) ont pu déterminer de cette façon le rôle joué par chacun des composants moléculaires dans le fonctionnement des ribosomes. Il a été ainsi montré que la reconstitution des sous-unités nécessite la présence de rRNA spécifiques et de protéines ribosomiques également spécifiques.

La reconstitution des sous-unités 50S pose davantage de problèmes. Ces dernières apparaissent plus complexes puisqu'elles contiennent deux molécules de rRNA (23S et 5S) et environ 35 protéines différentes.

Nomura et Erdmann (18) après avoir dissocié les sous-unités 50S de Bacillus stearothermophilus en ses divers constituants ont réussi à reconstituer des particules 50S actives au cours de la synthèse protéique.

Ce n'est que récemment que des particules 50S actives ont pu être reconstituées à partir des différents constituants des sous-unités 50S d'E.coli par H.Maruta et coll. (20). La reconstitution nécessite la présence des sous-unités 30S ; le RNA 5S est indispensable.

Ces résultats soulignent l'extrême complexité des sous-unités d'E.coli. La question de savoir comment les différents constituants ribosomiques sont agencés pour former des sous-unités 30S a été abordée par Traub et Nomura (44-46). Plus récemment, Mizushima et Nomura (47-48) ont constaté que l'addition des protéines durant la reconstitution était séquentielle et fortement "coopérative". Cependant, les informations relatives à la topographie de ces sous-unités 30S demeurent rares ce qui s'explique par le grand nombre de configurations théoriques possibles.

Les techniques chimiques et enzymatiques semblent apporter une aide considérable pour élucider l'arrangement des protéines. Certains réactifs chimiques permettent de différencier les groupements "exposés" des groupements "cachés" de ces protéines et ainsi de déterminer leur accessibilité. Ces études topographiques entreprises seulement dans le cas des sous-unités 30S d'E.coli ont permis de classer des protéines en deux catégories :

- les protéines internes
- les protéines externes

Les premières ne réagissent pas avec les différents réactifs chimiques contrairement aux secondes qui leurs sont accessibles.

CHAPITRE II

ACTION DES SELS SUR LES RIBOSOMES

2-1. Introduction

L'environnement ionique des ribosomes joue un rôle fondamental dans le maintien de leur structure et de leur activité : la dissociation des ribosomes et la réassociation des sous-unités obtenues dépendent des valeurs de la concentration du milieu en Mg^{++} et en monocations. Nous exposerons successivement dans ce chapitre l'influence des bications et des sels monocationiques sur les ribosomes.

2-2. Rôle des cations bivalents

2-2-1. Rôle du Mg^{2+}

Le rôle du Mg^{2+} dans le maintien de la structure des ribosomes est connu depuis longtemps (7, 49) : l'absence de Mg^{2+} provoque le relâchement de la structure des sous-unités ribosomiques de bactéries (50-51) et de mammifères (52). Les ribosomes de bactéries et ceux de mammifères n'ont pas le même comportement aux faibles concentrations de Mg^{2+} :

-les ribosomes d'E.coli se dissocient en présence de Mg^{2+} 0,1mM (53) en leurs deux sous-unités qui se réassocient après dialyse contre un tampon riche en Mg^{2+} et conservent leur activité au cours de la synthèse protéique.

-les ribosomes de mammifères se dissocient partiellement pour des concentrations en Mg^{2+} inférieures ou égales à $1 \cdot 10^{-5} M$. Les sous-unités obtenues ne se réassocient pas en présence de concentrations élevées de Mg^{2+} et sont inactives (5). Cependant, la dissociation complète des ribosomes de mammifères en sous-unités nécessite l'utilisation d'un agent chélatant tel que l'EDTA à une concentration de 20mM. Des comparaisons effectuées (6) entre des sous-unités inactives préparées avec de l'EDTA (54) et des sous-unités actives obtenues après traitement des ribosomes par l'urée montrent que les sous-unités EDTA ont perdu leur RNA 5S. Leur poids moléculaire est très semblable à celui des sous-unités obtenues avec l'urée : l'enlèvement du RNA 5S et de quelques protéines ne modifie pas de façon appréciable le poids moléculaire des sous-unités (55). Les sous-unités EDTA sédimentent plus lentement que les sous-unités actives ce qui indique des modifications structurales déjà décrites chez les ribosomes d'*E.coli* (56), de réticulocytes de lapin (57), de champignons (58).

Ces résultats sont confirmés par l'étude au microscope électronique des sous-unités obtenues en présence d'urée ou d'EDTA puisque ces dernières présentent une structure moins compacte.

2-2-2. Effet des autres cations bivalents

2-2-2-1. Sur l'association des sous-unités ribosomiques

Les sous-unités ribosomiques de foie de rat mises en présence de cations bivalents tels que le Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} peuvent se réassocier en monosomes alors que le Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} et Ni^{2+} inhibent cette réassociation.

Le pourcentage de réassociation dépend des concentrations respectives de K^+ et de bications dans le milieu. Une augmentation du rapport K^+ sur bications empêche l'association des sous-unités en monosomes (59).

2-2-2-2. Sur l'activité des sous-unités de foie de rat

Des expériences réalisées (3) en dialysant les sous-unités contre différents sels bivalents (1mM) pendant 18 heures ont permis d'étudier l'influence du Mn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} et Zn^{2+} sur chacune des sous-unités.

Les expériences d'hybridation entre des sous-unités traitées par ces cations bivalents et des sous-unités standard mettent en évidence le fait que le Mn^{2+} peut se substituer au Mg^{2+} dans les deux sous-unités. Le Ca^{2+} inactive la sous-unité 60S alors que la 40S garde son activité. Par contre, le Ba^{2+} , Sr^{2+} et Zn^{2+} ne peuvent remplacer le Mg^{2+} puisqu'ils inactivent les deux sous-unités. Le fait que le Ca^{2+} inactive la sous-unité 60S alors qu'il n'inactive pas la sous-unité 40S indique que les sites de fixation des cations sur les sous-unités 60S présentent une plus grande spécificité.

2-3. Rôle des cations monovalents

2-3-1. Rôle des monocations à faible concentration

L'importance des monocations dans le fonctionnement des ribosomes est restée longtemps ignorée. Il était généralement admis, en effet, que les monocations n'avaient aucune fonction spécifique si ce n'est de déplacer les ions Mg^{2+} formant des liaisons covalentes entre les deux sous-unités ou d'assurer dans le milieu une force ionique convenable (60). Ce n'est que récemment que le rôle de certains monocations, en particulier le K^+ , dans l'activité des ribosomes ou des sous-unités de bactéries (61, 62), d'insectes (63), d'animaux marins (64) et de mammifères (65) a été mis en évidence.

Les ribosomes de bactéries dialysés contre un milieu dépourvu de sels monocationiques (K^+ ou NH_4^+) deviennent inactifs : chacune des sous-unités est incapable d'assurer ses fonctions respectives (61-62, 66-67). Cependant,

ces sous-unités peuvent être réactivées à une température de 30° ou plus et en présence de K^+ ou NH_4^+ .

Les conditions de température et d'environnement ionique nécessaires pour restaurer l'activité suggèrent que l'inactivation est due à un changement de conformation réversible des sous-unités.

Chez les insectes (63), l'absence de K^+ entraîne une dissociation irréversible des sous-unités et une modification de conformation de ces dernières.

Les ribosomes de mammifères sont dissociés en leurs deux sous-unités et ne peuvent incorporer la polyphénylalanine en présence de polyU lorsqu'ils sont dans un milieu dépourvu de K^+ . Ces effets demeurent irréversibles même si la concentration du milieu en K^+ est restaurée (65).

Il a été montré par ailleurs que la dialyse des deux sous-unités ribosomiques de foie de rat contre un milieu dépourvu de K^+ provoquait l'inactivation irréversible de la sous-unité 60S seule (3). Le tampon de dialyse doit contenir une concentration suffisante de K^+ pour maintenir l'activité des sous-unités : cependant le K^+ peut être remplacé par le Rb^+ et NH_4^+ alors que le Li^+ , Na^+ et Cs^+ ne le remplacent que partiellement. Les résultats obtenus avec les sous-unités 40S sont différents (3) : les 40S dialysées contre un milieu dépourvu de K^+ peuvent se réassocier avec des sous-unités 60S standard.

2-3-2. Effet des monocations à concentration élevée sur les ribosomes

2-3-2-1. Sur l'activité des sous-unités

De nombreux auteurs ont pu préparer des sous-unités

actives à partir de ribosomes de bactéries par traitement avec des solutions concentrées de sels monocationiques ; c'est ce qu'ont réussi Spirin et coll. (68), Suzuka et coll. (69) entre autres, en soumettant des ribosomes d'E.coli à l'action de NH_4Cl ou LiCl .

De même, des résultats identiques ont pu être obtenus ultérieurement (70,75) avec les ribosomes de mammifères par action de solutions concentrées de KCl (0,5-1M).

L'étude comparative de l'action des divers sels monocationiques sur la dissociation des ribosomes de foie de rat (1,2) permet de distinguer deux types de monocations :

-d'une part le KCl , RbCl , NH_4Cl 0,3-0,5M le NaCl 0,3M qui dissocient les ribosomes en leurs deux sous-unités actives au cours de la synthèse protéique. Ces deux sous-unités se réassocient en présence de Mg^{2+} .

-d'autre part le LiCl et le CsCl 0,3M qui dissocient facilement les deux sous-unités, mais inactivent sélectivement la sous-unité 60S. Les deux sous-unités ne se réassocient pas en présence de Mg^{2+} .

Enfin, le NaCl 0,5M inactive les deux sous-unités.

Il est intéressant de remarquer que le Li^+ et le Cs^+ qui ont une action particulière et voisine sur les sous-unités 60S représentent respectivement le premier et le dernier cation du groupe des alcalins. Leur rayon ionique 0,60 Å (Li) et 1,69 Å (Cs) possèdent les valeurs extrêmes entre lesquelles sont comprises celles du K^+ du Rb^+ et du Na^+ .

2-3-2-2. Sur l'extraction des RNA de faible poids moléculaire.
.....

Le traitement des ribosomes d'E.coli par une solution de LiCl 2M en présence d'une faible concentration de Mg^{++} élimine environ 70 à 80% du RNA 5S et 50% de protéines ribosomiques (76). Le RNA 5S se retrouve dans le liquide surnageant démontrant ainsi que son élimination ne correspond pas à une dégradation. De même le traitement des ribosomes d'E.coli par le KCl et le NaCl 2M provoque la dissociation d'une quantité de protéines sensiblement égale à celle éliminée dans le cas des ribosomes traités par le LiCl 2M (76). En revanche, la quantité de RNA de faible poids moléculaire contenue dans les particules traitées par KCl et NaCl s'avère peu différente de celle des ribosomes de départ : le Li^+ a donc un effet spécifique sur le RNA 5S (76).

Siddiqui et Hosokawa (77) ont étudié l'influence du Mg^{2+} sur l'extraction du RNA 5S. En présence de Mg^{2+} , le RNA 5S est fortement associé aux sous-unités 50S ; le traitement par le LiCl, le NH_4Cl 1M ou le désoxycholate 0,5% n'enlève pas le RNA 5S. De fortes concentrations de CsCl en présence de Mg^{2+} 0,04M ne provoquent pas l'élimination du RNA 5S mais celle d'une grande quantité de protéines : la perte du RNA 5S et l'enlèvement des protéines semblent donc se faire indépendamment.

Par contre, si les sous-unités 50S sont dialysées contre un milieu dépourvu de Mg^{2+} et contenant du NH_4Cl 0,5M, 80% du RNA 5S est enlevé (77). La diminution de la concentration en Mg^{2+} ou le traitement des ribosomes par des agents chélatants tels que l'EDTA entraîne le relâchement de la structure des ribosomes et la libération du RNA 5S sous forme d'un complexe ribonucléoprotéique (78).

Le relâchement du RNA 5S nécessite des conditions identiques pour les ribosomes eucaryotes. L'EDTA provoque, comme nous l'avons vu, en présence d'une faible force ionique l'extraction (également sous forme d'un complexe ribonucléoprotéique) (79) du RNA 5S des ribosomes de foie de rat ou de réticulocytes de lapin (55).

2-3-2-3. Sur la dissociation des protéines

a) Des ribosomes d'E.coli

Des solutions concentrées de sels monocationiques (CsCl, NaCl, LiCl) enlèvent aux ribosomes d'E.coli des protéines dont certaines sont indispensables à leur activité biologique. Il est possible de reconstituer des sous-unités actives en ajoutant aux particules inactives les protéines enlevées par ces sels (80-85).

Itoh et coll. d'une part (33), Lermann et coll. (84) d'autre part, ont ainsi préparé des particules déficientes en protéines par action de concentrations variées de sels monocationiques et de Mg^{2+} sur les ribosomes de bactéries. En présence de Mg^{2+} , l'extraction des protéines est lente (85) et varie avec la nature des sels. En absence de Mg^{2+} le détachement des protéines est rapide et la différence d'action entre les sels tend à disparaître. Ces auteurs ont montré de plus, que la dissociation des protéines du RNA se fait par extractions successives de groupes de protéines spécifiques et que la conformation des ribosomes est un facteur déterminant dans le détachement des protéines par les sels.

b) Des ribosomes de mammifères.

Les travaux récents suggèrent que l'on peut aussi extraire de façon réversible certaines protéines de ribosomes de mammifères (71,86,87,88,89).

La quantité de protéines détachées des ribosomes par les sels dépend de nombreux facteurs et tout particulièrement de la nature et de la concentration en sel et en Mg^{2+} .

En présence de concentrations élevées de Mg^{2+} , les protéines ribosomiques sont protégées contre l'action des sels (88). Pour de faibles concentrations de Mg^{2+} la quantité de protéines extraites augmente avec la concentration du sel (88).

Les sous-unités préparées avec du LiCl, NaCl, KCl, NH_4Cl et CsCl 0,3M ont une teneur en protéines voisine de celle des ribosomes témoins. Au-delà d'une concentration en sel de 0,3M la quantité de protéines extraites des sous-unités 40S augmente (3) alors que très peu de protéines sont dissociées des sous-unités 60S. L'extraction de quantités croissantes de protéines des sous-unités se fait par étapes (90), comme dans le cas des ribosomes de bactéries traités par les sels monocationiques.

2-4. Rôle des polyamines

Les polyamines ont été mises en évidence dans les ribosomes de bactéries, d'E.coli (91,92) ou de foie de mammifères (93-95). Ces substances basiques ayant plusieurs fonctions amines se comportent comme des polycations et présentent une grande affinité pour les polyanions comme les acides nucléiques. Tout comme les bications, les polyamines semblent former des liaisons ioniques (96) avec le RNA (97) ce qui leur confèrerait un rôle important dans le maintien de la structure des ribosomes.

DEUXIEME PARTIE

TECHNIQUES

I - PREPARATION DES RIBOSOMES DE MAMMIFERES (98)

1.1. Préparation des microsomes

Les foies prélevés sur des rats à jeun depuis 12 heures sont lavés dans un tampon A (saccharose 0,35M, KHCO_3 0,035M, KCl 0,025M, MgCl_2 $4 \cdot 10^{-5}$ M, K_2HPO_4 et KH_2PO_4 0,02M).

Toutes les opérations sont effectuées à la température de 4°C. Les foies coupés en fins morceaux, sont homogénéisés à l'aide d'un appareil de Potter-Elvehjem dans le tampon A (10g de foie pour 23ml de tampon A).

Après centrifugation de l'homogénat à 20 000xg pendant 10mn, le culot C_1 contenant les noyaux, mitochondries et débris cellulaires est éliminé.

Le surnageant SN_1 est centrifugé deux heures à 80 000xg; le culot C_2 obtenu contient les microsomes. Le surnageant SN_2 est conservé et servira à préparer le t-RNA chargé avec un amino-acide.

1-2. Préparation des ribosomes à partir des microsomes

Les microsomes sont mis en suspension manuellement avec l'homogénéiseur dans le tampon A (100mg de microsomes dans 45ml de tampon A).

Une solution de MgCl_2 0,1M est alors ajoutée goutte à goutte sous agitation magnétique jusqu'à l'obtention d'une concentration finale en MgCl_2 de 0,009M.

Pour solubiliser la membrane du réticulum endoplasmique on ajoute un détergent, le désoxycholate de sodium (DOC) à 3% de telle sorte que sa concentration dans le milieu est de 0,26%.

Le mélange est agité pendant 15mn, puis centrifugé 90mn à 100 000xg.

Le culot C_3 contenant les ribosomes est mis en suspension dans une solution de MgCl_2 0,001M à laquelle on ajoute une solution de MgCl_2 0,1M jusqu'à une concentration finale en MgCl_2 de 0,05M.

Après agitation du mélange durant 15 mn, on centrifuge pendant 20mn à 80 000xg.

1-3. Lavage des ribosomes

Le culot est lavé avec un volume de $MgCl_2$ 0,01M égal à 0,3 fois le poids de foie, puis centrifugé 10mn à 120 000xg. Ces opérations sont répétées quatre fois.

Les ribosomes sont ensuite mis en suspension dans 5ml de tampon A et dialysés 12 heures contre le tampon contenant un mélange de KH_2PO_4 et K_2HPO_4 1mM de $MgCl_2$ 0,2mM et de saccharose 3%.

La solution dialysée est centrifugée à 14 000xg pendant 15mn pour enlever le matériel insoluble. La suspension de ribosomes congelée par l'azote liquide est conservée à $-20^{\circ}C$.

II - TRAITEMENT DES RIBOSOMES PAR LES SELS

2-1. Principe de la méthode

Les ribosomes de foie de rat ainsi obtenus, soumis à des solutions concentrées de différents sels monocationiques, sont dissociés en sous-unités (1).

Comme nous l'avons vu, le pourcentage et les propriétés des sous-unités obtenues dépendent de la nature du sel monocationique.

Les sous-unités sont préparées en centrifugeant les ribosomes à travers une couche de saccharose 2M contenant les divers sels.

Les ribosomes sédimentent au fond du tube, tandis que les protéines ribosomiques extraites par les sels et une fraction du RNA se retrouvent au-dessus de la couche de saccharose.

2-2. Méthode expérimentale

10mg de ribosomes sont mis en suspension dans 7ml de tampon sel 0,5M, (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 1mM), $MgCl_2$ 0,2mM, β -mercaptoethanol 20mM et déposés au-dessus de 2ml d'une solution de même concentration saline que ci-dessus mais additionnée de saccharose 2M. Après une centrifugation de 12h à 110 000xg les deux couches sont prélevées et les culots, purifiés de tous contaminants, conservés au congélateur.

III - SEPARATION DES SOUS-UNITES

Martin et coll. (99,73,74) ont été les premiers à réussir la dissociation des ribosomes de muscle et de foie en sous-unités actives et leur recombinaison en particules capables d'incorporer la polyphénylalanine en présence de polyU.

Cette séparation des ribosomes en sous-unités est obtenue à l'aide de concentrations élevées de KCl (0,5M).

Une autre méthode décrite par Lawford (100) consiste à incuber les ribosomes en présence de puromycine qui décroche la chaîne polypeptidique naissante, permettant ainsi d'éviter le traitement par de hautes concentrations en KCl. Dans notre travail expérimental, nous avons traité les ribosomes de foie de rat par les divers sels monocationiques (KCl , NH_4Cl , $NaCl$, $LiCl$, $CsCl$).

3-1. Méthode expérimentale

Les sous-unités ribosomiques obtenues sous l'action des différents sels à la concentration de 0,3M sont centrifugées à travers un gradient discontinu de saccharose, selon la méthode décrite précédemment. Les culots des sous-unités sont alors mis en suspension dans un tampon comprenant du bicarbonate de potassium 0,02M et du β -mercaptoéthanol 20mM ; ce tampon de faible force ionique empêche leur précipitation et permet de les maintenir à l'état dissocié.

La séparation des sous-unités s'effectue ensuite par centrifugation (16h à 55 000xg avec le rotor SW25) à travers un gradient continu de saccharose de composition suivante :

- Tris 50mM-HCl pH= 7,5
- KCl 0,15M
- MgCl₂ 1mM
- β -mercaptoéthanol 20mM
- saccharose 15%-50%

Le gradient linéaire est établi de telle sorte que la concentration en saccharose soit de 50% au bas du tube et de 15% au sommet.

Après centrifugation, on recueille des fractions de 20 gouttes. La densité optique de chacune d'elles est déterminée à 260nm. Le profil de sédimentation des sous-unités ainsi obtenues est représenté dans la Fig.1.

Pour pallier tout risque de contamination des sous-unités entre elles, seules les fractions correspondant à la partie hachurée ont été collectées.

3-2. Traitement des sous-unités

Les fractions les plus pures des sous-unités 40S et 60S sont rassemblées et traitées de différentes façons.

Dans une première série d'expériences, nous avons précipité les sous-unités en amenant la concentration

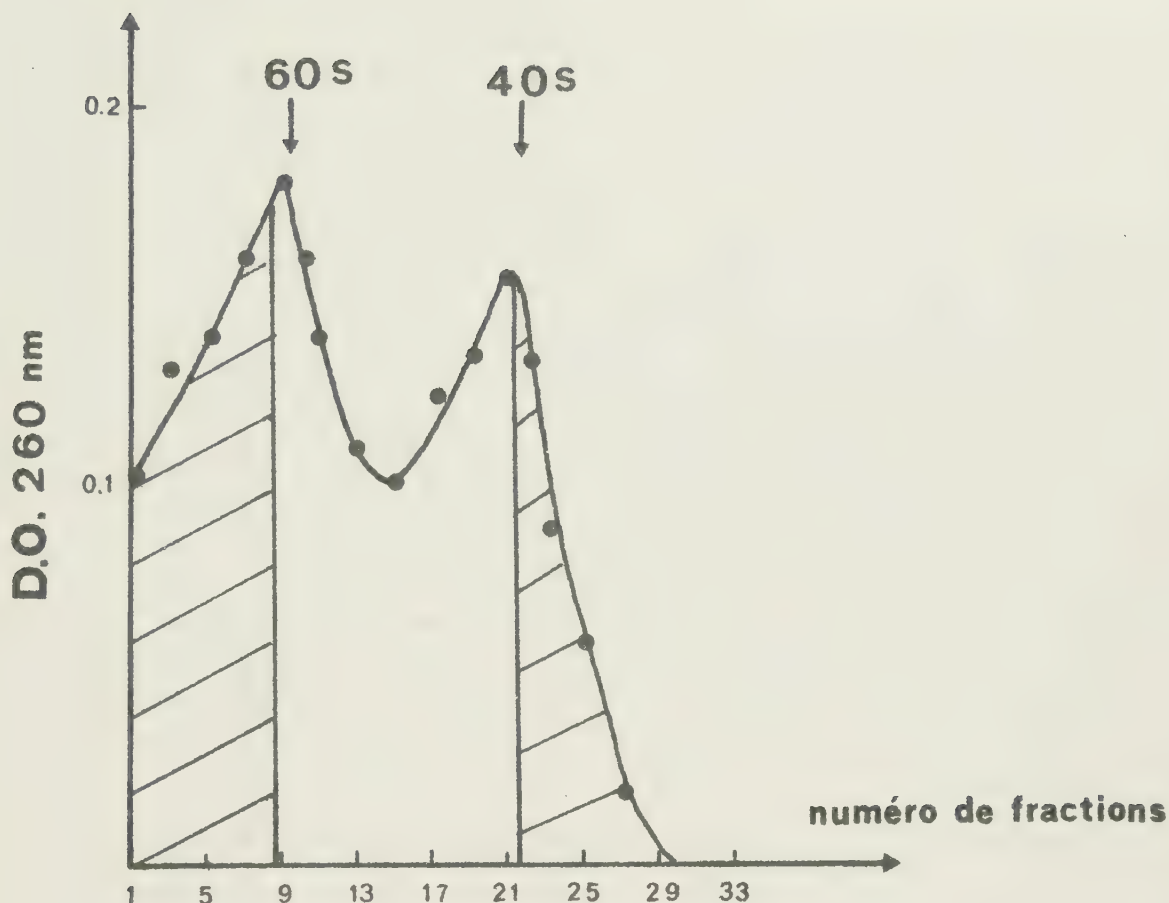


Fig. 1 : Diagramme de sédimentation des sous-unités ribosomiques préparées avec les différents sels monocationiques.

8mg de sous-unités, obtenues par centrifugation des ribosomes à travers une couche de saccharose contenant les divers sels monocationiques, sont déposés sur un gradient continu de saccharose (15-50%) préparé dans le tampon (Tris 50mM-HCl pH=7,5, KCl 0,15M, $MgCl_2$ 1mM, β -mercaptoéthanol 20mM). La durée de centrifugation est de 16h à 55 000xg dans le rotor SW 25. Des fractions de 20 gouttes sont collectées et la densité optique de chacune d'elles est déterminée à 260nm. Les sous-unités 60S et 40S correspondent aux fractions 1-8 et 22-30 respectivement. La contamination des sous-unités 60S par les sous-unités 40S est inférieure à 5%, les sous-unités 40S sont complètement pures.

du milieu en MgCl_2 à 50mM.

Il convient au préalable de diluer trois fois la solution afin de diminuer la viscosité due à la forte concentration en saccharose.

Après 12 heures à 4°C , les sous-unités précipitent et sont centrifugées ; les protéines des sous-unités présentes dans le culot sont extraites par une solution de LiCl-urée. Dans une deuxième série d'expériences, nous soumettons les sous-unités à l'action d'un agent chimique, le bleu procion. Comme la forte concentration du milieu en Mg^{2+} favorisant la formation d'agrégats aurait limité l'action du bleu procion, nous avons d'abord dialysé les sous-unités pendant une nuit contre le tampon $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 1mM, KCl 30mM, MgCl_2 1,5mM, β -mercaptoéthanol 20mM afin d'éliminer le saccharose avant l'action du bleu procion.

Les solutions sont concentrées par dialyse contre du Séphadex G200.

IV - TECHNIQUES DE MESURE DE L'ACTIVITE DES SOUS-UNITES OBTENUES APRES TRAITEMENT DES RIBOSOMES PAR LES SELS.

L'étude systématique et comparative de l'action des sels monocationiques sur l'activité a été effectuée avec les ribosomes de foie de rat (1).

4-1. Principe de la méthode

L'activité des sous-unités est mesurée par l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ phénylalanine aux protéines en présence ou en l'absence d'acide polyuridylique qui joue le rôle de messenger.

4-2. Technique utilisée

Les ribosomes sont incubés en présence des constituants nécessaires à la synthèse protéique (101) dans 0,125ml d'un milieu contenant :

-une quantité définie de ribosomes dont on veut mesurer l'activité

-6,25 μ moles de tris-HCl (pH = 6,85 mesuré à 25°)

-10 μ moles de $MgCl_2$: c'est pour cette concentration en $MgCl_2$ que les ribosomes ont le maximum d'activité

-0,25 μ moles de guanosine tri-phosphate (pH:6,7) nécessaire à la fixation des aminoacyl-t-RNA sur les ribosomes et à la translocation

-2 μ moles de dithiothréitol nécessaire pour assurer l'activité de l'enzyme de transfert

-25 μ g d'acide polyuridylique servant de matrice pour la synthèse de la polyphénylalanine. Pour mesurer l'activité endogène des ribosomes, on supprime l'acide polyuridylique. La concentration en $MgCl_2$ du milieu est alors diminuée de 10mM à 8mM.

-70 μ g de t-RNA chargé avec de la $[^{14}C]$ phénylalanine (5000 coups/min.). La préparation de ce t-RNA s'effectue à partir du surnageant post-microsomal par extraction au phénol. Ce tRNA est d'abord déchargé de ses amino-acides par incubation à 37° pendant 1 heure dans du tampon Tris M (pH = 8,9), puis rechargé avec la $[^{14}C]$ phénylalanine en présence du surnageant 100 000x de foie.

-des enzymes de transfert permettant la fixation du phénylalananyl-tRNA sur les ribosomes et la translocation.

Après incubation du mélange à 37° pendant 30mn, on hydrolyse le RNA en chauffant le mélange durant 10mn à 90° en présence de T.C.A. 5% : les protéines précipitent.

Le précipité est filtré sur un disque en fibre de verre (Whatman GF/C). Le T.C.A. est éliminé par un mé-

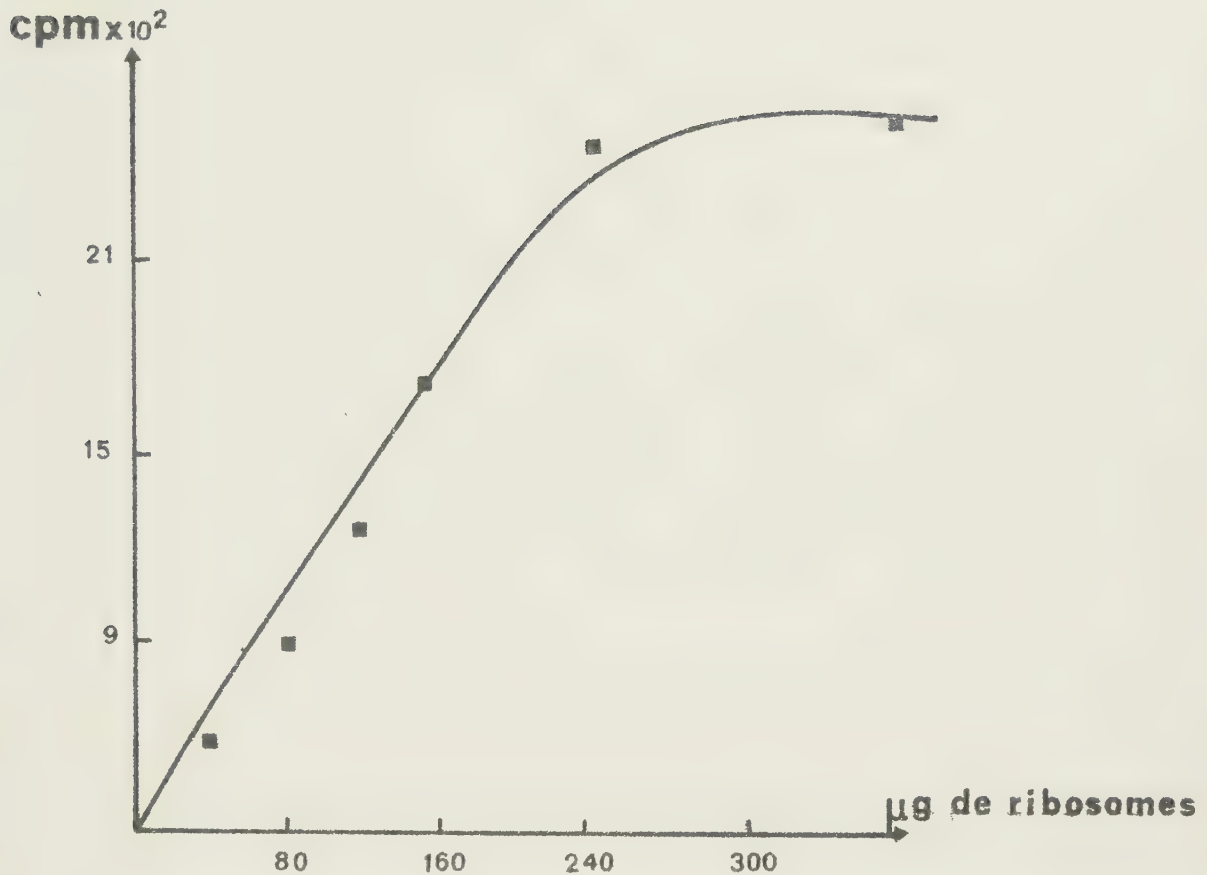


Fig.2 : Diagramme d'activité des ribosomes normaux

Les ribosomes sont incubés pendant 30 mn à 37°C dans un volume total de 0,125ml avec 6,25 μ moles de Tris-HCl ($\text{pH} = 7,4$) , 10 μ moles de KCl, 1,25 μ moles de MgCl_2 , 2 μ moles de dithiothreitol, 0,25 μ mole de GTP, 25 μg de polyU, 70 μg de [^{14}C] phénylalanine -t-RNA (5 000 coups/min) et 75 μg de fraction protéique provenant du surnageant de foie (enzymes de transfert).

La radioactivité incorporée (coups/min) est mesurée dans un compteur à scintillation Tri-carb.

lange de chloroforme, d'éther et de méthanol (2 : 1 : 1, v/v/v). Les filtres sont séchés. La radioactivité est comptée par scintillation dans un compteur Tricarb. Le liquide scintillant utilisé est constitué d'une solution de toluène contenant du PPO et du diméthyl POPOP.

4-3. Diagramme d'activité des ribosomes

4-3-1. Ribosomes normaux

La figure 2 représente la quantité de [^{14}C]phénylalanine incorporée en fonction de la quantité de ribosomes mise dans le milieu d'incubation. Au-delà d'une certaine quantité de ribosomes, la courbe atteint un plateau : les constituants indispensables à la synthèse protéique sont limitants par rapport à la quantité de ribosomes ajoutée dans le milieu.

4-3-2. Ribosomes traités par les différents sels monocationiques

Les activités des ribosomes soumis à l'action des divers sels à des concentrations variant de 0,3 à 0,7M ont été mesurées. La figure 3 traduit les résultats obtenus en pourcentage de l'activité des ribosomes normaux en fonction de la concentration en sel dans le milieu. Il ressort de cette figure, que les ribosomes traités par NaCl, NH_4Cl , KCl 0,3M sont plus actifs que les ribosomes témoins, tandis que ceux mis en présence de CsCl et LiCl se trouvent inactivés même pour une concentration en sel de 0,3M.

Le NaCl a une position intermédiaire entre ces deux catégories de sel : augmentation de l'activité par rapport aux témoins pour une concentration de 0,3M, inactivation presque totale à 0,5M. Dans tous les cas on observe une diminution de l'activité lorsque la concentration en sel augmente au-delà de 0,3M.

L'augmentation d'activité constatée en présence de KCl, NH_4Cl , NaCl 0,3M s'explique par le fait que ces

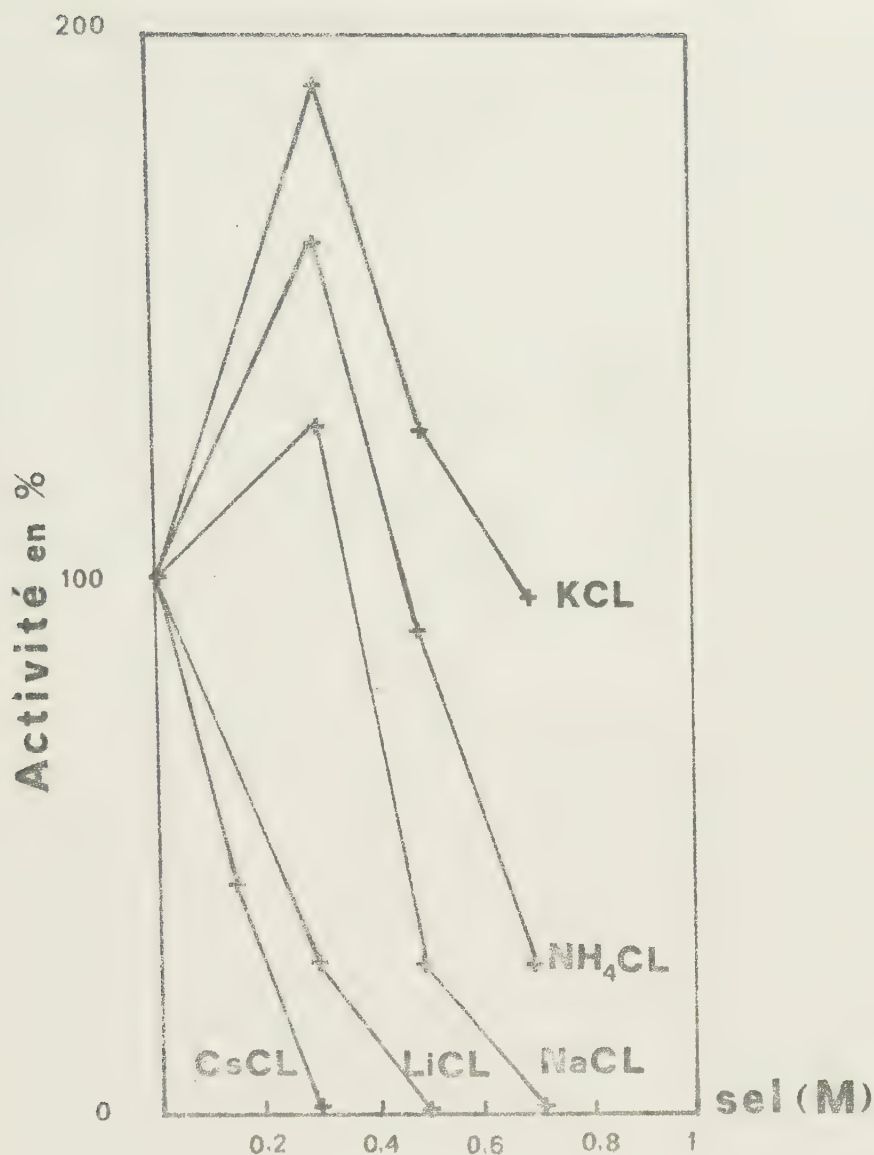


Fig. 3 : Diagramme d'activité des sous-unités préparées avec les divers sels

Les ribosomes centrifugés à 4°C, en présence de concentrations croissantes de sels monocationiques sont incubés en présence des constituants nécessaires à la synthèse protéique (cf. texte).

L'activité des ribosomes centrifugés en l'absence de sels monocationiques est prise égale à 100. L'activité des sous-unités préparées avec les sels monocationiques est exprimée en pourcentage de l'activité des ribosomes normaux.

sels ont pour effet d'enlever le m-RNA resté fixé sur les ribosomes : la fixation de l'acide polyuridylique se fait alors plus facilement.

V - METHODE D'EXTRACTION DES PROTEINES

Deux méthodes sont généralement utilisées pour séparer les protéines des RNA sans donner de résultats significativement différents. L'une consiste à traiter les ribosomes par l'acide acétique (102), l'autre utilise l'association du LiCl à l'urée pour extraire les protéines ribosomiques.

Dans une première série d'expériences, nous avons extrait les protéines des sous-unités ribosomiques de foie de rat en les dialysant 48 heures contre le LiCl 2M selon la méthode décrite par Curry et coll. (103). Il se forme un précipité de RNA éliminé par centrifugation (1h à 105 000xg). La solution de protéines est ensuite dialysée 48 heures contre le tampon acétate de sodium 0,033M (pH = 5,6), urée 6M et β -mercaptoéthanol 20mM. On concentre alors la suspension de protéines par dialyse contre du Séphadex G200 sec jusqu'à un volume de 0,1ml environ.

Dans une deuxième série d'expériences, une légère variante de la méthode précédente a été utilisée. Les sous-unités sont précipitées par du $MgCl_2$ à la concentration finale de 50mM. Après centrifugation, le culot est repris par une solution contenant du LiCl 2M, de l'urée 6M, de l'acétate de sodium 0,033M et du β -mercaptoéthanol 20mM.

Les RNA précipitent et sont éliminés par centrifugation. Le surnageant contient les protéines solubles. Nous avons vérifié à partir de protéines de ribosomes témoins, que le diagramme d'électrophorèse obtenu en utilisant l'une ou l'autre des techniques ne variait pas.

VI - ELECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE DES PROTEINES RIBOSOMIQUES

On utilise la méthode de Reisfeld et coll. (104) les gels (diamètre des pores : 50 Å) renferment de l'urée 8M et 7,5% d'acrylamide. Les électrophorèses ont lieu à pH = 4,3. Dans ces conditions les protéines ribosomiques de foie de rat migrent toutes vers la cathode d'une distance qui dépend à la fois de leur taille, de leur forme et de leur charge électrique.

Les gels ont été préparés à partir des solutions concentrées suivantes :

a) Tampon pH = 4,3 , urée 8M

KOH N 12ml

acide acétique glacial 4,3ml

TEMED 1ml

urée 12g

H₂O q.s.p. 25ml

b) Tampon pH=6,7 , urée 8M

KOH N 12ml

acide acétique glacial 0,72ml

TEMED 0,12ml

urée 12g

H₂O q.s.p. 25ml

c) acrylamide 7,5g

N.N' méthylène bisacrylamide 0,2g

H₂O q.s.p. 25ml

d) acrylamide 5g

N.N' méthylène bisacrylamide 1,25g

H₂O q.s.p. 25ml

e) riboflavine 1mg

urée 12g

H₂O q.s.p. 25ml

Le gel I est préparé extemporanément en mélangeant dans une seringue 4ml de chacune des solutions A et B :

solution_A

solution (a) 2,5ml

solution (c) 5,0ml

urée 13,6g

H₂O q.s.p. 10ml

solution_B

persulfate d'ammonium 0,028g

urée 4,8g

H₂O q.s.p. 10ml

Les solutions A et B peuvent être conservées une semaine à 4°C.

Dans la partie inférieure d'un tube à électrophorèse, on dépose le gel (I) qui renferme de l'acrylamide, du TEMED (N,N,N',N' tétraméthylène diamine), du bisacrylamide, du persulfate d'ammonium aux concentrations finales suivantes : 7,5% (g/v), 0,48% (v/v), 0,2% (g/v), 0,14% (g/v) respectivement.

Au-dessus du gel I précédemment décrit, on dépose la solution II renfermant 2,5% d'acrylamide, et de la riboflavine. Cette solution préparée extemporanément à l'abri de la lumière sert à concentrer les fractions protéiques.

Ce gel II comprend :

1,25ml de (b)

1,25ml de (d)

1,25ml de (e)

6ml d'urée 10M

H₂O q.s.p. 10ml

On verse dans chacun des tubes 1,2ml de gel I puis 50 µl d'eau pour aplanir la surface du gel ; la polymérisation du gel est terminée au bout de 20mn. On recueille alors l'eau et l'on rince la surface du gel avec la solution II. On ajoute ensuite 0,5ml de gel II. On aplanit de nouveau la surface du gel sur laquelle on dépose, après les 20 mn nécessaires à la polymérisation du gel II, 50 à 100 µl d'une suspension de protéines mélangées à du gel II et à un soupçon de pyronine.

Après polymérisation les tubes sont emboîtés par leur partie supérieure dans les trous d'un cristalliseur, c'est le compartiment anodique, et plongent dans le bac cathodique. Le tampon d'électrophorèse (pH = 4,3) utilisé contient 31,2g de β -alanine et 8ml d'acide acétique concentré par litre.

L'électrophorèse débute alors avec une intensité de 3mA par tube et l'on suit la migration des protéines par rapport à celle de la pyronine, substance de référence. Après migration des protéines, on colore les gels par une solution d'acide acétique 7,5% renfermant 0,5% de noir amido 12 BN. Les gels décolorés par électrophorèse (8mA/tubes) en présence d'acide acétique 7,5% sont conservés dans de l'acide acétique 7,5% à l'abri de la lumière, puis photographiés : les négatifs sont enregistrés avec un microdensitomètre Joyce.

VII - TRAITEMENT PAR LE BLEU PROCION

Les sous-unités 60S sont en suspension dans 1ml de tampon K_2HPO_4 - KH_2PO_4 3mM, $MgCl_2$ 0,2mM, saccharose 3% et β -mercaptoéthanol 20mM(4). Les sous-unités sont traitées pendant deux minutes exactement à 0° par 50 μ l d'une solution fraîchement préparée de bleu procion brillant M.R. dissous dans l'alcool méthylique (5mg/ml). La concentration finale en bleu procion est de 0,35mM. Après ce traitement, on dilue immédiatement la suspension dans 10 volumes du tampon et l'on centrifuge 1 heure à 120 000xg. Le culot renferme donc les sous-unités sur lesquelles se sont fixées les molécules de bleu procion : on en extrait les protéines avec une solution de LiCl 2M, urée 6M, acétate de sodium 0,033M et β -mercaptoéthanol 20mM.

VIII - OBTENTION DES RNA RIBOSOMIQUES

La technique utilisée consiste en une extraction des RNA ribosomiques par le procédé au phénol à 20°C (105). Les RNA obtenus par cette méthode renferment une très faible quantité de protéines ribosomiques. C'est pourquoi, cette méthode a été choisie préférentiellement par rapport à l'extraction du RNA avec le SDS.

8-1. Extraction des rRNA par le SDS (106)

Les rRNA et les protéines peuvent être dissociés par addition de 0,1 volume de SDS 2%, NaCl 1M, acétate de sodium 0,1M à pH = 5 ; ce mélange est agité vigoureusement et incubé à 22°C pendant 15 mn.

On peut analyser les rRNA du mélange sur un gradient de saccharose, mais cette méthode ne peut pas être utilisée pour préparer des rRNA qui devront ensuite être soumis à la filtration sur gel. En effet, le mélange obtenu contient les différents rRNA et les protéines ribosomiques. et ces dernières gêneraient la filtration sur gel des rRNA

En conséquence, la méthode généralement utilisée consiste en une extraction au phénol à 20°C.

8-2. Extraction des rRNA par le phénol à 20°C

Le culot obtenu par centrifugation des ribosomes à travers une couche de saccharose est mis en suspension dans une solution d'acétate de sodium 10mM. On extrait ensuite les rRNA par le phénol à 20°C. Cette extraction peut donner lieu à la formation d'agrégats entre les différents constituants ribosomiques.

Pour éviter ce phénomène dépendant de la concentration en ribonucléoprotéines, l'extraction est faite, à la température ordinaire, à partir de suspension à faible concentration de ribosomes (2mg/ml).

On utilise du phénol préalablement distillé sous atmosphère d'azote et saturé d'eau à 20%.

On ajoute à la suspension de ribosomes un volume égal de phénol saturé d'eau et un inhibiteur de la RNase, le polyvinylsulfate (PVS 50 μ g/ml).

Le mélange est soumis à l'agitation magnétique pendant 20 minutes, puis centrifugé 10mn à 9000xg.

Il se forme deux couches (aqueuse et phénolique), le RNA se trouvant dans l'hypophase, c'est-à-dire la phase aqueuse.

A l'aide d'une pipette on prélève le surnageant SN_1 et l'on conserve la phase phénolique P_1 . On ajoute un volume égal de phénol saturé d'eau au surnageant SN_1 ainsi que 50 μ g/ml de PVS.

On agite le mélange pendant 20mn puis on le centrifuge durant 10mn à 9 000xg.

Le surnageant SN_2 est prélevé et conservé à 4°C. On rassemble les phases phénoliques P_1 et P_2 , les tubes étant rincés avec l'acétate de sodium 10mM. Les phases phénoliques sont centrifugées 10mn à 9 000xg. La phase aqueuse SN_3 recueillie est mélangée à SN_2 . L'ensemble est de nouveau centrifugé 20mn à 9 000xg pour éliminer le matériel insoluble et éventuellement le phénol restant.

8-3. Précipitation des rRNA

Les rRNA sont précipités par deux volumes d'alcool éthylique à 0°C, en présence de 0,1 volume d'acétate de sodium 10mM à pH = 5,9. Après précipitation à -20°C pendant quelques heures, le RNA est centrifugé 2 heures à 65 000xg.

Le culot est mis en suspension dans de l'EDTA 10^{-4} M. Comme les ions Mg^{2+} favorisent la formation de complexes entre les rRNA, l'addition d'EDTA permet l'élimination de ces cations par chélation. Le mélange est

centrifugé 10mn à 100 000xg afin d'éliminer le matériel insoluble. On conserve le surnageant tandis que le culot est repris dans un très petit volume d'EDTA 10^{-4} M. Cette opération est répétée plusieurs fois afin de s'assurer que tout le RNA a été dissous.

Le RNA dialysé pendant quelques heures contre l'éluat, à savoir du tampon acétate de potassium 10mM à pH = 7, est soumis à une filtration sur gel.

IX - FILTRATION DES RNA SUR GEL DE SEPHADEX

Dans la méthode d'extraction au phénol précédemment décrite, on obtient les rRNA totaux.

La technique de filtration sur gel de Séphadex permet de séparer les différents RNA. Le but de l'expérience étant de séparer les RNA 4S et 5S de poids moléculaire 25×10^3 et 35×10^3 (107) daltons respectivement, nous avons utilisé dans toutes les expériences du Séphadex G100 dont le domaine de fractionnement est compris entre les poids moléculaires 1000 et 150 000. Dans ces conditions, les RNA 28S et 18S, dont la moyenne des poids moléculaires est de $2,3 \times 10^6$ (7) daltons sont exclus tandis que les RNA 4S et 5S sont retenus.

On utilise une colonne de type Pharmacia (100cm x 3cm). Le gel est mis à gonfler dans de l'eau distillée pendant 3 jours. Les rRNA sont filtrés en présence du tampon acétate de potassium 10mM (pH = 7), avec un débit d'élution de 2,5ml/heures/cm². L'éluat est fractionné dans un collecteur Gilson muni d'un dispositif de comptage de gouttes. La densité optique est lue à 260nm sur chaque fraction (2,5ml environ).

X - SEPARATION DES RNA SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

La séparation par la méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est basée sur des différences de forme et de taille des divers RNA, compte-tenu du fait que le rapport de la charge sur la masse des diverses molécules demeure constant.

En utilisant cette caractéristique, Richards et Gratzer (108-109) ont mis au point une méthode de séparation des RNA de faible poids moléculaire sur gel de polyacrylamide. Le taux de migration à travers le gel est inversement proportionnel au coefficient de sédimentation du RNA ; il est ainsi possible d'établir une corrélation entre le poids moléculaire et la mobilité électrophorétique.

Le but de l'expérience étant de séparer principalement les RNA 4S et 5S, la concentration du gel utilisé est de 7,5% (Par convention, la concentration du gel est exprimée par le pourcentage d'acrylamide seulement contenu dans le gel).

Les gels sont préparés à partir des solutions stocks suivantes :

- 1) acrylamide 30g
N,N' méthylène bisacrylamide 0,3g
H₂O q.s.p. 100

La solution est conservée à l'abri de la lumière.

- 2) TEMED 0,8 ml
tampon dilué 2,5 fois q.s.p. 100

- 3) ferricyanure de potassium 0,03%

- 4) persulfate d'ammonium 0,48%

Lors de la préparation du gel les quatre solutions sont mélangées à volume égal, de sorte que la concentration des divers constituants dans le gel est la suivante :

-acrylamide 7,5% (g/ml)

-N,N' méthylène bisacrylamide 0,2% (g/ml)

-TEMED 0,11% (ml/ml)

-persulfate d'ammonium 0,12% (g/ml)

Le tampon d'électrophorèse renferme du Tris 0,05M-
acide acétique pH =7,8 et de l'EDTA 0,015M.

Le gel est versé dans des tubes à électrophorèse de 5mm de diamètre intérieur. La surface est aplanie par addition d'eau. Après la polymérisation du gel qui dure environ 1 heure, on dépose la solution de RNA (100 μ g environ) saturée avec du saccharose et contenant une infime quantité de bleu de bromophénol.

On repère la migration des rRNA par rapport à celle du bleu de bromophénol. La migration s'effectue de la cathode vers l'anode et une intensité de 5mA par tube est appliquée.

Après l'électrophorèse, les gels sont colorés dans une solution d'acide acétique 7,5% renfermant 0,5% de bleu de méthylène qui se fixe sur le RNA. Une électrophorèse en présence d'acide acétique 7,5% permet l'élimination de tout le bleu de méthylène non fixé.

On met ainsi en évidence la migration plus rapide du RNA 4S vers l'anode sous forme d'une bande large, le RNA 5S présentant une bande étroite.

TROISIEME PARTIE

RESULTATS

Etude de la modification de conformation et de la teneur en RNA de faible poids moléculaire des grosses sous-unités ribosomiques sous l'action de divers cations.

CHAPITRE I

MODIFICATION DE LA CONFORMATION DES SOUS-UNITES RIBOSOMIQUES 60S DE FOIE SOUS L'ACTION DE DIVERS CATIONS

1-1. Principe de la méthode

Le bleu procion se combine aux protéines accessibles des sous-unités. Ainsi, les changements de conformation de ces dernières, peuvent exposer de nouvelles protéines à l'action du bleu procion. On peut obtenir de cette façon des informations relatives à la conformation des sous-unités.

Les sous-unités préparées par traitement des ribosomes avec les différents sels ont donc été soumises à l'action de ce réactif. Les protéines des sous-unités 60S extraites avant et après le traitement par le bleu procion ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les protéines ribosomiques combinées au bleu procion sont insolubles et par conséquent, éliminées par centrifugation.

1-2. Comparaison des protéines des grosses sous-unités préparées avec différents sels

Dans une première série d'expériences, les protéines extraites des grosses sous-unités par un tampon contenant du LiCl 2M et de l'urée 6M ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Fig. 4, A, B, C). Les bandes représentées sur le diagramme d'électrophorèse (Fig. 4 A, B, C) ont été numérotées arbitrairement de 1 à 16 selon leur mobilité électrophorétique. On constate ainsi que les diagrammes

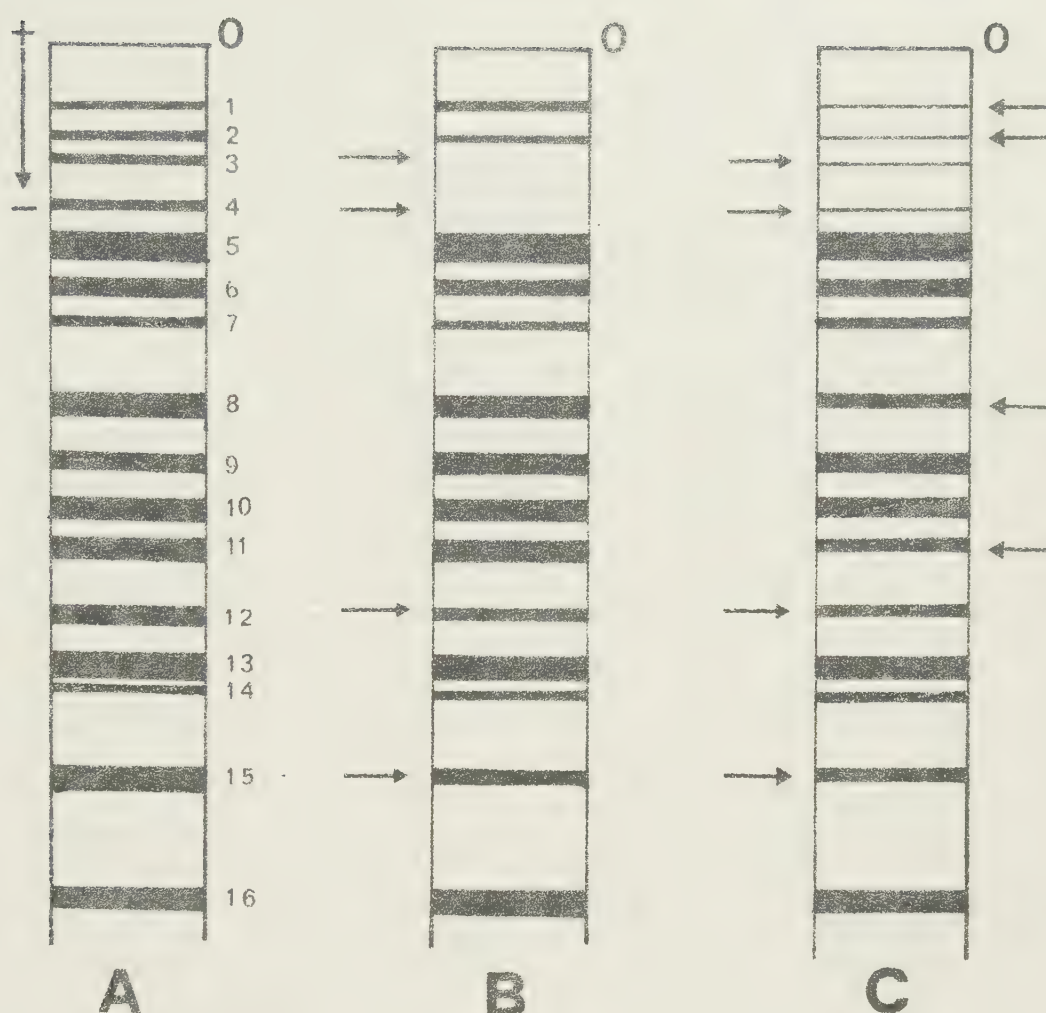


Fig.4 : Diagrammes d'électrophorèse des protéines des sous-unités 60S

Les protéines des sous-unités 60S obtenues par action de KCl, LiCl, CsCl 0,3M sur les ribosomes sont extraites par une solution de LiCl 2M, urée 8M, acétate de sodium 0,033M et β -mercaptoéthanol 20mM et soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5%. Le diagramme des protéines des sous-unités 60S préparées avec KCl 0,3M (A) est pris comme référence ; les différences observées entre ce diagramme et ceux obtenus avec les protéines des sous-unités 60S préparées avec LiCl 0,3M (B) et CsCl 0,3M (C) sont indiquées par des flèches.

Les bandes correspondant aux protéines sont numérotées arbitrairement de 1 à 16 selon leur mobilité électrophorétique.

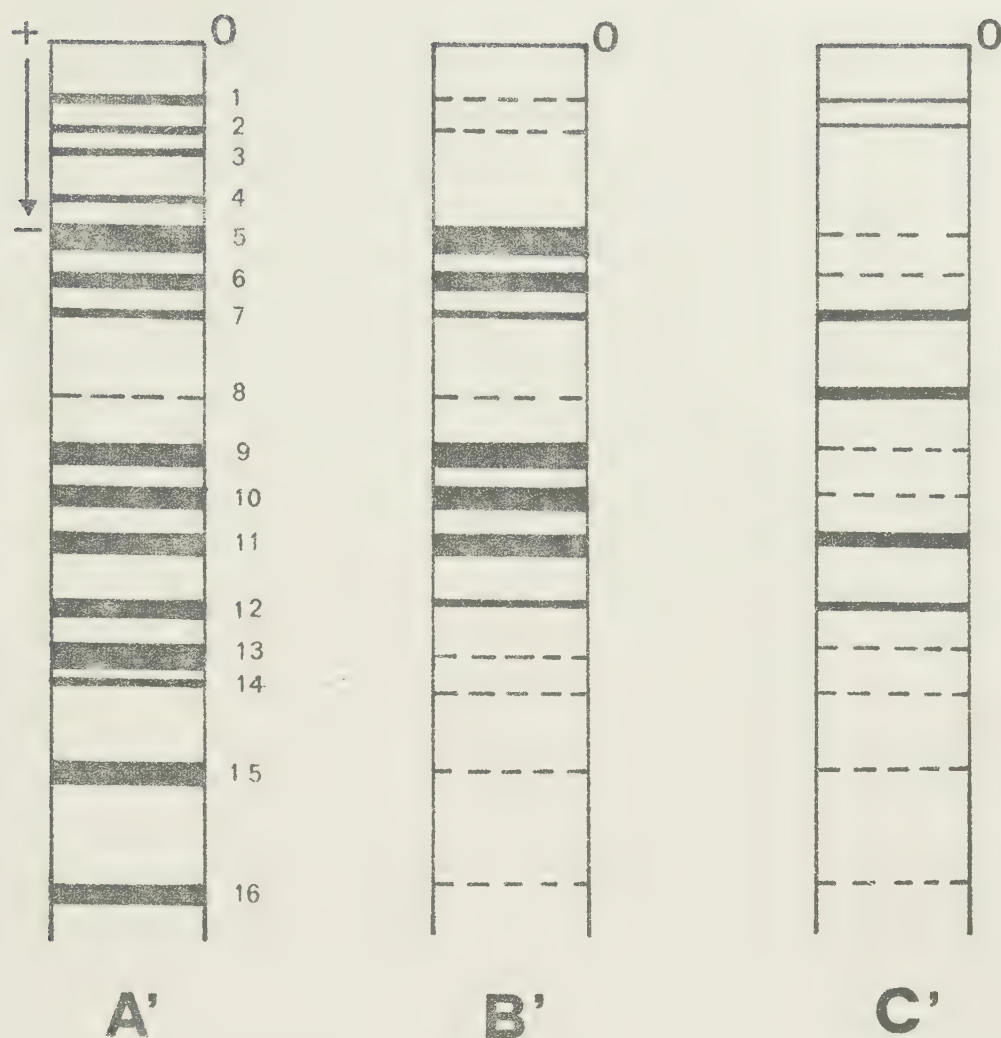


Fig. 4' : Effet du bleu procion brillant MR sur les protéines des sous-unités 60S préparées avec divers cations monovalents

Les protéines des sous-unités 60S préparées avec KCl (A'), LiCl (B'), CsCl (C') 0,3M et traitées par le bleu procion brillant MR sont extraites par une solution de LiCl 2M, urée 8M, acétate de sodium 0,033M et β -mercaptoéthanol 20mM. Les protéines ayant fixé le bleu procion sont insolubles et éliminées par centrifugation.

Les bandes discontinues correspondent aux protéines partiellement extraites par le traitement au bleu procion.

obtenus à partir des grosses sous-unités préparées avec du KCl, du NH_4Cl et du NaCl 0,3M sont identiques. Par contre, les sous-unités préparées avec du LiCl 0,3M ont perdu complètement deux protéines 3 et 4 et partiellement les protéines 12 et 15 (Fig. 4 B). Quant aux sous-unités préparées avec du CsCl 0,3M, elles ont perdu en partie non seulement les quatre protéines précédentes (3,4 12,15) mais aussi les protéines 1,2,8,11 (Fig. 4C).

Ces différences qualitatives observées entre la composition en protéines des grosses sous-unités préparées avec les divers sels ne représentent cependant que de faibles variations de la teneur globale en protéines de ces sous-unités. En effet, les déterminations de densité par centrifugation isopychnique dans un gradient de CsCl donne des valeurs très voisines pour les divers types de grosses sous-unités (1,62-1,63) (2). Une estimation directe de la teneur en protéines des sous-unités peut être faite en dosant les protéines extraites par le mélange LiCl 2M-urée 6M. Cependant, le dosage n'a pu être effectué par la méthode de Lowry étant donné la concentration élevée du milieu en LiCl et en urée qui perturbent les mesures. La quantité de protéines extraites a donc été déduite de l'absorption à 280nm en prenant $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1$. Malgré la relative imprécision de cette détermination, due en particulier à la présence d'une faible quantité de RNA extraits, les résultats obtenus (tableau 2) confirment les données de centrifugation isopychnique. Le rapport protéine / RNA est égal à 1 dans le cas des sous-unités préparées avec les différents sels. Seules, les grosses sous-unités préparées avec du CsCl ont une teneur protéique légèrement plus faible que les autres. Les divers sels monocationiques n'enlèvent qu'une quantité négligeable de protéines aux 60S dans les conditions utilisées pour leur préparation.

1-3. Comparaison des protéines restant après traitement par le bleu procion

1-3-1. Diagramme d'électrophorèse des protéines des sous-unités 60S après action du bleu procion

Le traitement des sous-unités 60S par le bleu procion produit des modifications caractéristiques du diagramme d'électrophorèse des protéines mais à des degrés différents suivant les sels (Fig. 4 A', B', C'). Dans le cas des sous-unités 60S préparées avec du KCl, la protéine 8 a presque complètement disparu. La sous-unité 60S obtenue avec du LiCl perd de surcroît la plus grande partie des protéines 1,2,13,14,15 et 16. Les sous-unités 60S, préparées avec du CsCl, gardent la protéine 8 mais perdent les protéines 3,4,5,6,9,10,14,15 et 16, plus ou moins complètement. En outre, les diagrammes d'enregistrement des gels montrent des pics beaucoup mieux résolus après le traitement par le bleu procion qu'avant, ce qui s'explique par le fait qu'un certain nombre de bandes mineures présentes dans les sous-unités témoins ont disparu.

1-3-2. Dosage des protéines des sous-unités 60S soumises au bleu procion (Tableau 2)

Nous avons vu que la teneur en protéines des sous-unités 60S préparées en utilisant du NaCl, KCl ou CsCl 0,3M est très voisine avant traitement par le bleu procion. Lorsque l'on mesure, par la même méthode que précédemment, les quantités de protéines extraites des sous-unités après action du bleu procion, on constate dans tous les cas qu'une partie des protéines des sous-unités n'est plus extractible. La quantité de protéines ayant réagi avec le colorant représente à peu près le même pourcentage dans les sous-unités préparées avec KCl et NaCl (20-26%). Par contre, dans les

TABEAU 2

Quantité de protéines exposées au bleu procion brillant MR dans les sous-unités préparées avec divers sels monocationiques.

La teneur en protéines des sous-unités 60S préparées avec divers sels monocationiques a été déterminée par mesure de l'absorption à 280nm avec $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 1,0$.

Dans le cas des protéines extraites des sous-unités traitées par le bleu procion une correction a été faite pour tenir compte de l'absorption à 280nm du bleu procion résiduel.

Le pourcentage de protéines enlevées a été calculé en admettant que la teneur des sous-unités en RNA est restée sensiblement la même.

Sous-unités 60S	Bleu procion brillant	$\frac{\text{Protéine}}{\text{RNA}}$	protéines en- levées en %
K ⁺	-	1,0	0
	+	0,80	20
Na ⁺	-	1,0	0
	+	0,74	26
Li ⁺	-	1,0	0
	+	0,47	53
Cs ⁺	-	0,91	9
	+	0,54	46

sous-unités préparées avec LiCl et CsCl, ce pourcentage est double (46-53%). Ceci confirme les données de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, puisque la quantité de protéines accessibles au colorant est bien plus grande dans le cas des sous-unités préparées avec le LiCl et CsCl, que dans le cas des sous-unités obtenues avec le KCl et NaCl.

1-4. Discussion

Les expériences qui viennent d'être décrites confirment d'abord que l'inactivation sélective des grosses sous-unités ribosomiques de foie par le LiCl ou CsCl 0,3M ne s'accompagne que d'une perte très faible de la quantité de protéines. Cette variation ne peut expliquer la diminution très notable de leur coefficient de sédimentation (50S au lieu de 60S) (2). Aussi, ces expériences permettent de mettre en évidence directement le changement de conformation des grosses sous-unités préparées avec ces deux cations. En effet, les protéines des sous-unités 60S actives sont protégées à des degrés divers contre l'action du bleu procion, sauf une : la protéine 8. Par contre, après action du LiCl ou du CsCl à une concentration aussi faible que 0,3M, une grande partie des protéines des sous-unités est exposée aux molécules de colorant qui peuvent se combiner à elles. Ceci indique que les sous-unités ont acquis une conformation beaucoup plus lâche. Ce changement de conformation peut expliquer, non seulement la diminution du coefficient de sédimentation, mais aussi l'inaptitude des sous-unités préparées avec le Li^+ et Cs^+ à s'associer avec des sous-unités 40S actives pour former des monosomes.

CHAPITRE II

EFFET DES CATIONS MONOVALENTS SUR LA TENEUR EN RNA DE FAIBLE POIDS MOLECULAIRE DES SOUS-UNITES

2-1. Analyse des RNA de faible poids moléculaire

2-1-1. Diagramme de filtration sur Séphadex G100

Le profil d'élution des RNA extraits des ribosomes témoins est représenté sur la figure 5A. Les RNA 18S et 28S sont élués immédiatement après le volume mort de la colonne sous forme d'un pic unique I. On observe ensuite la présence de deux pics III et IV qui sont retenus par le gel. Par analyse des RNA extraits des sous-unités (non séparées) préparées avec les divers sels 0,5M, on observe des diagrammes d'aspect similaire. Cependant, dans la plupart des cas, il existe un pic supplémentaire II, plus ou moins bien séparé du pic I. Ce pic est particulièrement apparent dans le cas des sous-unités préparées avec NH_4Cl (Fig.5C). La position du pic III sur le diagramme chromatographique correspond à celle décrite pour le RNA 5S ; le RNA contenu dans le pic IV peut être assimilé au RNA 4S car il est élué à la même place que le t-RNA préparé à partir du surnageant de foie. Afin de vérifier la nature des RNA contenus sous ces pics, les fractions correspondantes ont été collectées.

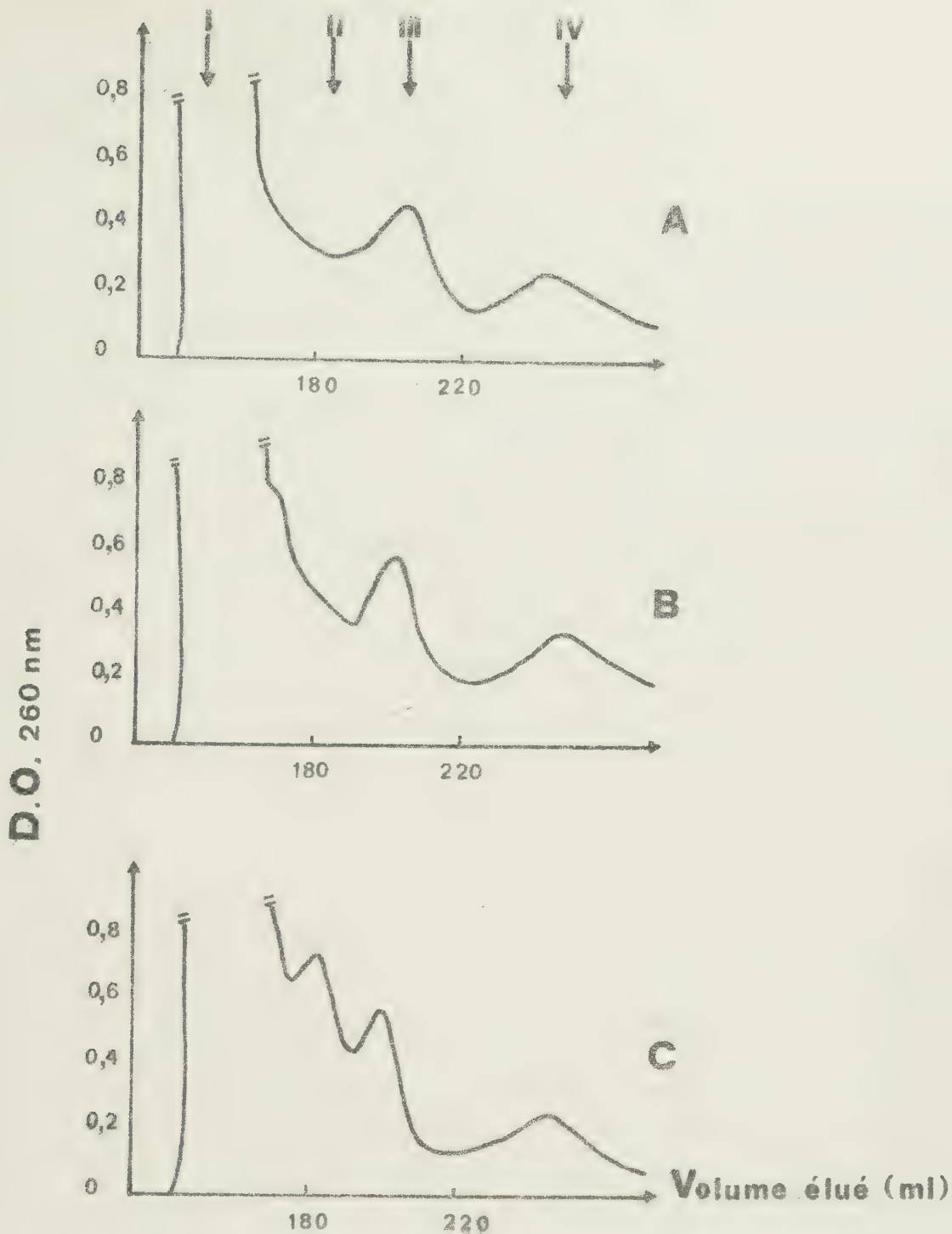


Fig. 5 : Diagramme de filtration des rRNA sur une colonne de Séphadex G100

Les rRNA extraits des ribosomes témoins (A) et des sous-unités préparées avec KCl 0,5M (B) et NH_4Cl 0,5M (C) sont séparés par filtration sur gel de Séphadex G100 en présence du tampon acétate de potassium 10mM (pH=7). Le débit d'élution est de 2,5ml/heures/cm². L'éluat est fractionné dans un collecteur : la densité optique est lue à 260 nm sur chaque fraction (2,5ml environ).

Les rRNA ont été précipités par deux volumes d'alcool éthylique à -20°C en présence de 0,1 volume d'acétate de sodium 10mM pH = 5,9 puis soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

2-1-2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des rRNA de faible poids moléculaire

La migration des RNA isolés des pics III et IV a été comparée avec celle du t-RNA préparé à partir du surnageant de foie et du RNA 5S extrait de foie de porc. Le matériel du pic III donne une bande unique de même mobilité électrophorétique que le RNA 5S de foie de porc et migre plus lentement que le RNA 4S ; le RNA IV a un Rf identique à celui du t-RNA du surnageant de foie (Fig.6).

2-1-3. Nature du RNA contenu dans le pic II

Le RNA du pic II, élué avant le RNA 5S, migre plus lentement que ce dernier au cours de l'électrophorèse. Par ailleurs, le traitement des ribosomes témoins par NH_4Cl 0,5M pendant un temps égal à celui utilisé pour préparer les sous-unités provoque aussi l'apparition de ce pic supplémentaire. Ce dernier pourrait représenter un produit de dégradation des grosses molécules de RNA. Cependant, l'électrophorèse du matériel contenu dans le pic II, met en évidence l'existence d'une bande parfaitement définie migrant plus lentement que le RNA 5S, et d'une bande moins visible correspondant au RNA 5S. Nous avons tenté de préciser les poids moléculaires de ce RNA. On sait qu'il existe généralement une relation entre le volume d'élution et le logarithme du poids moléculaire des RNA ribosomiques séparés sur une colonne de Séphadex. Une relation identique peut être retrouvée entre le loga-

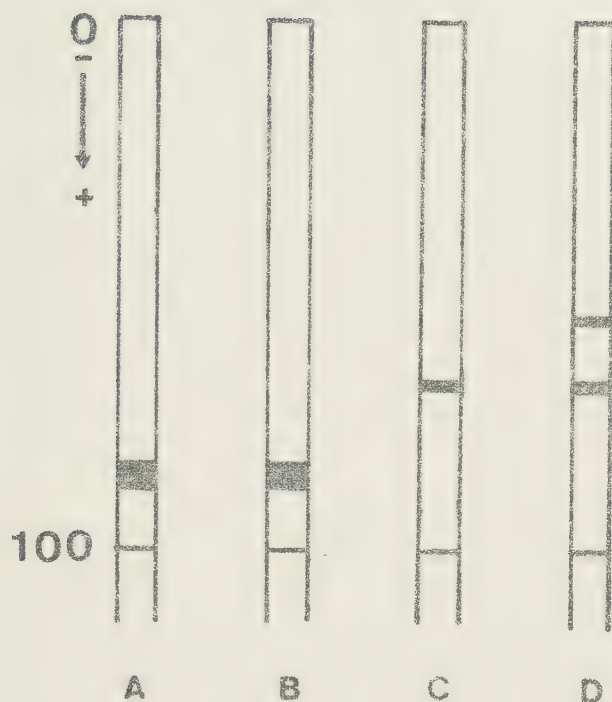


Fig. 6 : Electrophorèse des rRNA de faible poids moléculaire sur gel de polyacrylamide

A - RNA 4S témoin. Ce t-RNA est préparé à partir du surnageant post-microsomal.

B-C- RNA 4S et 5S. Les RNA des pics III et IV obtenus après filtration sur Séphadex G100 des rRNA (fig.5) extraits des ribosomes traités par les différents sels ont été précipités par deux volumes d'alcool éthylique à -20°C en présence d'acétate de potassium 10mM pH =5,9, et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

D - RNA contenu dans le pic II.(Fig.5c). Ce RNA est obtenu par filtration sur Séphadex G100 de rRNA extraits des ribosomes traités par NH_4Cl . Dans tous les cas la migration du bleu de bromophénol est prise égale à 100.

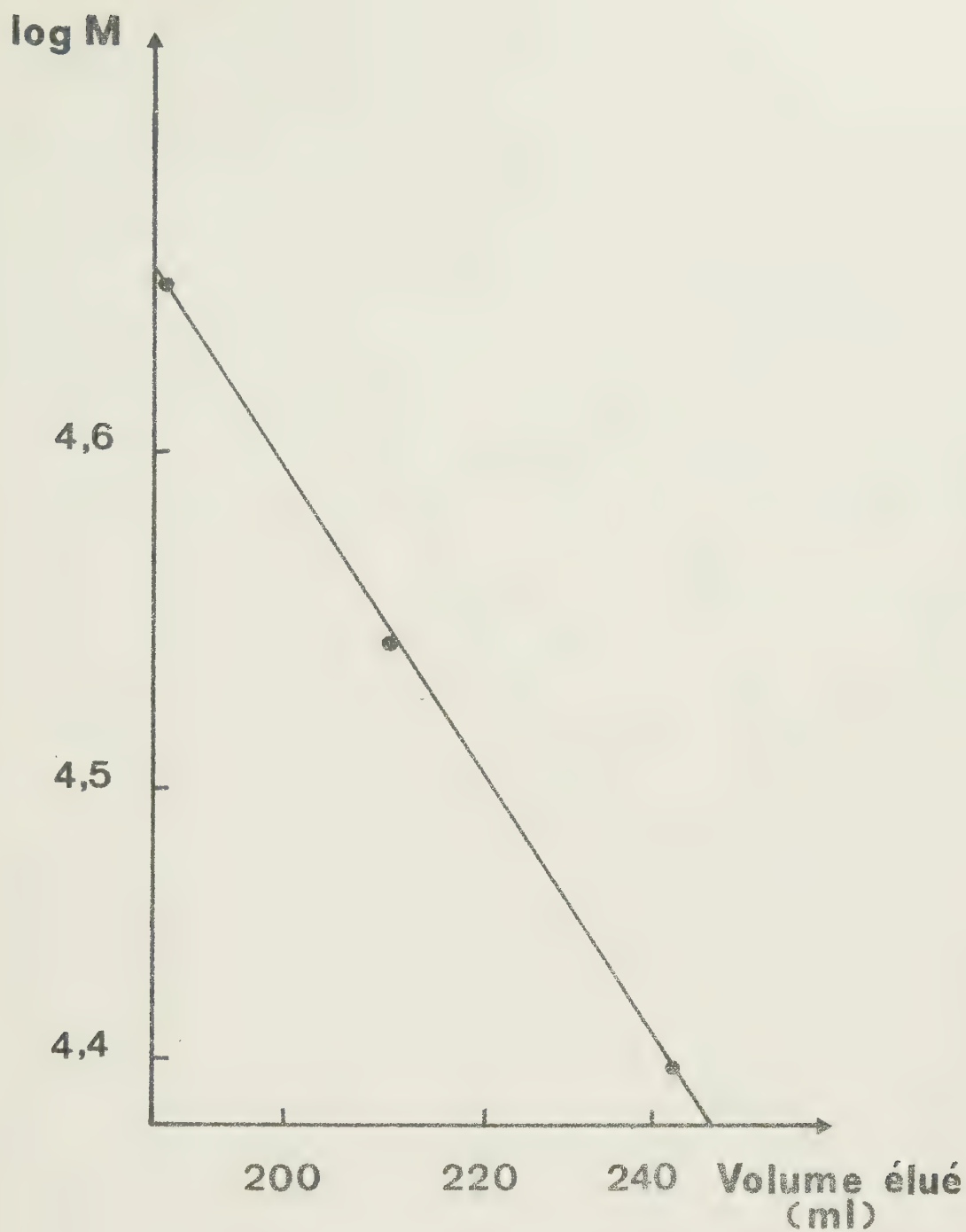


Fig. 7 : Détermination graphique du poids moléculaire du RNA contenu dans le pic II

A - Relation entre le volume d'élution des RNA des pics II, III, IV (Fig.5) sur une colonne de Séphadex G100 et le logarithme du poids moléculaire de ces RNA

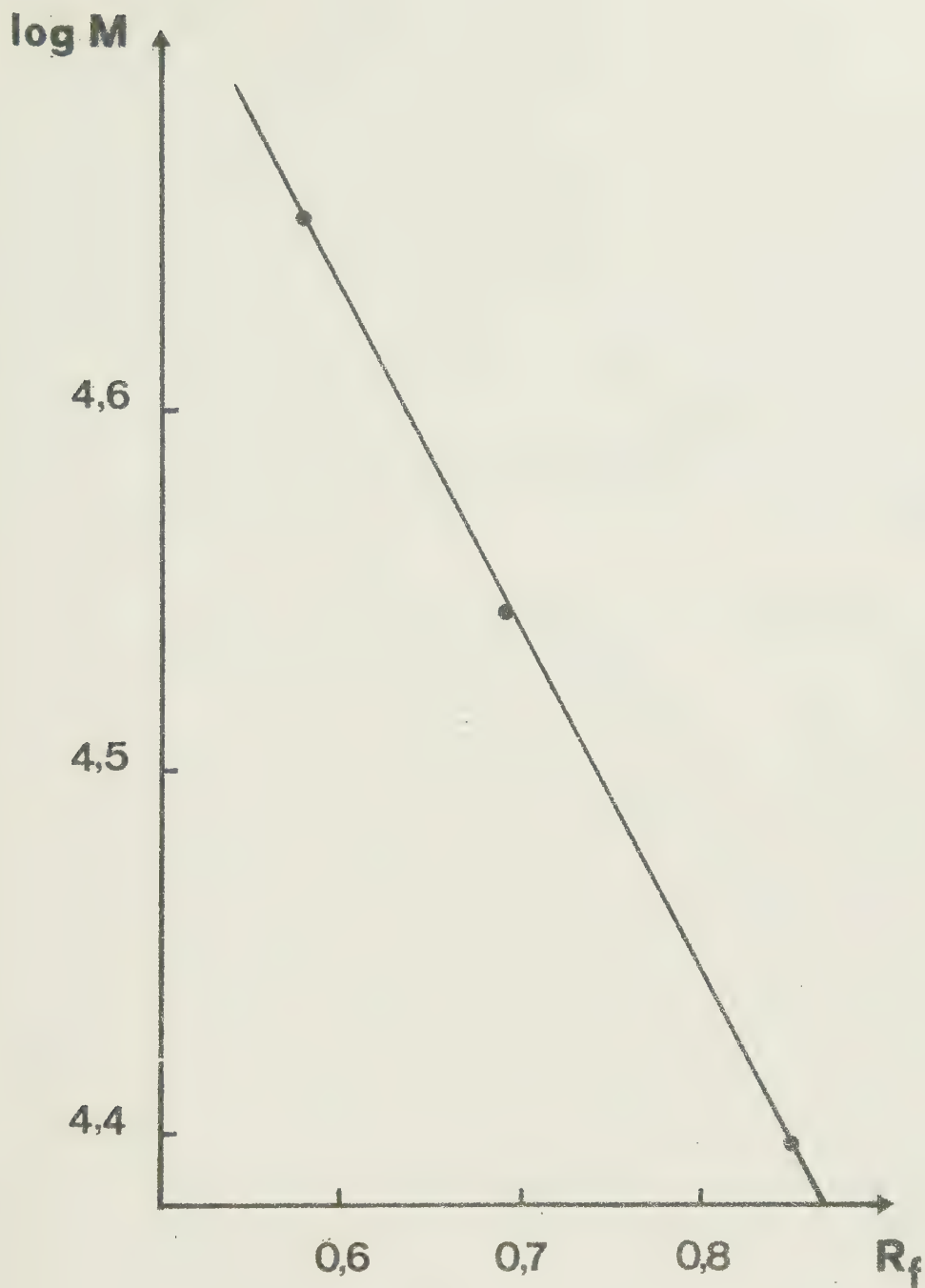


Fig. 7 : Détermination graphique du poids moléculaire du RNA contenu dans le pic II

B - Relation entre la mobilité électrophorétique (R_f) des RNA sur gel de polyacrylamide 7,5% et le logarithme du poids moléculaire de ces RNA. La mobilité est exprimée en fonction de celle du bleu de bromophénol.

rithme du poids moléculaire et la mobilité des RNA au cours d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le poids moléculaire du RNA du pic II a donc été déterminé en utilisant les deux techniques, chromatographique et électrophorétique, à partir des valeurs connues des poids moléculaires du t-RNA et du RNA 5S. La figure 7 A et B montre que les deux méthodes fournissent la même valeur pour le poids moléculaire du RNA du pic II, soit environ 45 000 daltons.

2-2. Etude quantitative de l'action des sels sur les RNA de faible poids moléculaire

Nous avons déterminé la teneur en RNA 5S et 4S des sous-unités préparées avec les divers cations monovalents : les valeurs se trouvent consignées dans le tableau 3 ci-joint. Tous les sels enlèvent une partie du RNA 5S des ribosomes, mais la quantité extraite varie considérablement suivant la nature du monocation. Un premier groupe de sels (KCl , NH_4Cl , RbCl , NaCl 0,5M) n'extraient que 20 à 30% de ce RNA, tandis qu'un deuxième groupe de sels (LiCl , CsCl 0,5M) en enlèvent de 50 à 70% (tableau 3). Il n'y a apparemment pas de différence significative entre le contenu en RNA 5S des grosses sous-unités actives préparées avec NaCl 0,3M et des sous-unités inactives préparées avec NaCl 0,5M.

La teneur en RNA 4S des ribosomes varie notablement suivant les préparations. Notons que KCl , RbCl , NH_4Cl 0,5M ainsi que NaCl 0,3M n'extraient que peu ou pas de RNA 4S à la différence du LiCl , CsCl et NaCl 0,5M qui en enlèvent une proportion importante ; si l'on excepte le cas du NaCl , les sels semblent donc avoir une action similaire sur l'extraction des RNA 4S et 5S.

TABLEAU 3

Teneur en RNA 5S et 4S des sous-unités préparées avec divers sels

Le nombre de molécules de RNA 5S par ribosome a été calculé en divisant par 1,58 les différentes valeurs trouvées pour le rapport $\frac{\text{aire des RNA 5S}}{\text{aire des RNA (23S+18S+5S)}}$ (voir figure 5). Cette valeur théorique de 1,58 a été calculée en admettant que les RNA 5S, 18S, 28S ont respectivement les masses moléculaires suivantes : 37×10^3 (107), $0,6 \times 10^6$, $1,7 \times 10^6$ (7) daltons.

Le nombre de molécules de RNA 4S par ribosome a été obtenu de la même manière à partir du rapport $\frac{\text{aire des RNA 4S}}{\text{aire des RNA (28S+18S+5S)}}$. Si l'on admet qu'il y a une molécule de t-RNA de poids moléculaire 25 000 daltons par ribosome, la valeur théorique de ce rapport est de 1,07.

TEMOIN		RIBOSOMES TRAITES PAR :				
		KCl	Na ₄ Cl	RbCl	CsCl	NaCl
						0,3N 0,5M
MOLECULES DE RNA PAR RIBOSOME						
5S RNA	1,0	0,81	0,84	0,74	0,48	0,32 0,73 0,70
4S RNA	1,0-	1,0-	1,0-	0,98	0,60	0,50 0,29 0,43
	1,5	1,5	1,5			

2-3. Discussion

La comparaison de la teneur en RNA 5S des sous-unités préparées avec les divers sels et des ribosomes témoins montre donc qu'à la même concentration (0,5M), le Li^+ et le Cs^+ extraient une quantité de RNA 5S bien supérieure à celle enlevée par les autres cations monovalents. Le dépliement des grosses sous-unités produit par ces deux cations explique très vraisemblablement cette libération du RNA 5S. En effet, ainsi que nous l'avons vu dans l'exposé bibliographique, le RNA 5S paraît être profondément enfoui dans la grosse sous-unité. On sait que les grosses sous-unités traitées par l'EDTA acquièrent aussi une conformation lâche et que ce changement de conformation est accompagné de la libération du RNA 5S. Il existe donc des analogies entre l'action des deux cations (Li^+ et Cs^+) et celle de l'EDTA.

La difficulté d'obtenir une réassociation correcte du RNA 5S avec les autres constituants ribosomiques pour former une sous-unité active a été signalée chez E.coli (16-17). Ceci pourrait expliquer l'inactivation irréversible que nous avons observée des grosses sous-unités ribosomiques de foie préparées avec le Li^+ et Cs^+ 0,5M lorsque les protéines et le RNA 5S extraits sont rajoutés à ces sous-unités (89).

Nous avons vu que les RNA extraits des sous-unités préparées avec différents sels (spécialement NH_4Cl) 0,5M contiennent une espèce supplémentaire ayant un poids moléculaire de l'ordre de 50 000 daltons. Il est possible que ce RNA soit un produit de dégradation des gros RNA ribosomiques en présence de sels concentrés. Il paraît cependant plus probable, étant donné que ce RNA forme par électrophorèse sur gel un bande parfaitement définie, qu'il représente du RNA 7S, dont la présence a déjà été signalée dans les sous-unités 60S (21-23). Le traitement salin et plus particulièrement l'ion NH_4^+ pourraient rompre les liaisons hydrogènes qui unissent le RNA 7S au RNA 28S.

CONCLUSIONS GENERALES

Les propriétés des sous-unités ribosomiques de foie, en particulier leur aptitude à se réassocier et à synthétiser des protéines, dépendent de la composition ionique du milieu dans lequel elles se trouvent, notamment de la nature et de la concentration des cations monovalents. Nous avons cherché dans ce travail à préciser l'action du Li^+ et du Cs^+ . Ces deux cations, à relativement basse concentration (0,3M), modifient sélectivement les propriétés des grosses sous-unités ribosomiques : elles deviennent incapables de se réassocier à des sous-unités 40S actives, perdent toute activité biologique et ont une constante de sédimentation anormalement basse bien qu'elles n'aient pratiquement pas perdu de protéines

1 - Dans une première série d'expériences, nous avons mis en évidence l'existence d'une modification de la conformation des grosses sous-unités ribosomiques lorsque le LiCl et le CsCl 0,3M sont utilisés au cours de leur préparation. Nous avons étudié l'action d'un colorant, le bleu procion, qui se fixe de façon covalente sur les protéines ribosomiques qui lui sont accessibles. Les protéines ribosomiques peuvent être extraites par du LiCl 2M-urée 6M et analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide tandis que les protéines combinées au réactif demeurent insolubles. En comparant les diagrammes d'électrophorèse obtenus avec des sous-unités préparées dans diverses conditions, il est ainsi possible de différencier les protéines accessibles au colorant de celles qui sont protégées contre son action.

Nos résultats confirment qu'avant traitement par le bleu procion, les grosses sous-unités préparées avec le LiCl et CsCl ont une teneur en protéines très voisine de celle des sous-unités actives préparées avec K^+ , ces

dernières étant prises comme référence. L'électrophorèse des protéines révèle cependant l'existence de modifications discrètes, portant sur un petit nombre de protéines dans les sous-unités préparées avec LiCl et CsCl. Lors du traitement par le bleu procion des sous-unités de référence, la plupart des protéines (sauf une) ne sont pas accessibles au réactif. Un traitement identique des sous-unités préparées avec LiCl et CsCl montre que le réactif peut se fixer sur un grand nombre de protéines. Ceci signifie que les sous-unités préparées avec LiCl et CsCl ont une conformation beaucoup plus lâche que les sous-unités actives de référence. Il est vraisemblable que cette modification de conformation est responsable de l'abaissement du coefficient de sédimentation des sous-unités ainsi que de leur incapacité à s'associer aux sous-unités 40S actives.

2 - Dans une deuxième série d'expériences, nous avons étudié la teneur en RNA de faible poids moléculaire des sous-unités préparées avec différents sels. Nous avons observé que pour une même concentration (0,5M), tous les sels enlevaient une certaine proportion de RNA 5S.

Mais, la quantité de RNA 5S extraite par le LiCl et CsCl (52-68%) est très nettement supérieure à celle extraite par les autres sels (16-30%). Etant donné que le RNA 5S semble être profondément enfoui dans la grosse sous-unité, il est naturel de penser que le départ des molécules de RNA 5S est lié au relâchement de la structure de cette sous-unité, particulièrement important en présence de Li^+ et Cs^+ . L'extraction du RNA 5S pourrait expliquer l'irréversibilité de l'inactivation des sous-unités obtenues avec le Li^+ et Cs^+ que nous avons observée.

L'analyse du contenu des sous-unités en RNA 4S donne, comme l'on pouvait s'y attendre, des résultats assez variables puisque ce RNA n'entre pas dans la constitution des sous-unités. Cependant, dans l'ensemble, le RNA 4S est extrait principalement par les sels qui enlèvent le plus de RNA 5S. Quant au RNA supplémentaire observé dans les diagrammes des sous-unités préparées avec les divers sels, et plus particulièrement avec NH_4Cl , il s'agit vraisemblablement du RNA 7S.

Il est probable que les liaisons hydrogène qui unissent le RNA 7S au RNA 28S se rompent sous l'action des sels.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - A.M. REBOUD, J.P. REBOUD, C. WITTMANN et M. ARPIN,
Biochim.Biophys.Acta, 213 (1970) 437.
- 2 - A.M. REBOUD, M. ARPIN, J.P. REBOUD, European J.Biochem.,
26 (1972) 347.
- 3 - A.M. REBOUD, M. BUISSON, J.P. REBOUD, European J. Biochem.,
26 (1972) 354.
- 4 - T. HULTIN, European J.Biochem., 9 (1969) 579.
- 5 - M.L. PETERMANN, A. PAVLOVEC, Biopolymers, 7 (1969) 73.
- 6 - M.G. HAMILTON, A. PAVLOVEC et M.L. PETERMANN, Bioche-
mistry, 10 (1971) 3424.
- 7 - M.L. PETERMANN, The physical and Chemical Properties of
Ribosomes, Elsevier, Amsterdam, 1964.
- 8 - M.W. SCHAUP, M. GREEN et C.G. KURLAND, Molec.Gen.Gene-
tics, 109 (1970) 193.
- 9 - R. ROSSET, R. MONIER, J. JULIEN, Bull.Soc.Chim.Biol., 46
(1964) 87.
- 10- B.G. FORGET et M. REYNIER, Biochem.Biophys. Res.Comm.,
39 (1970) 114.
- 11- J. FEUNTEUN et R. MONIER, Biochimie, 53 (1971) 657.
- 12- M. AUBERT, R. MONIER, M. REYNIER - J.F. SCOTT, in Struc-
ture and Function of Transfer RNA, Proc. Fourth FEBS
Meeting, 3 (1967) 151.
- 13- N. SARKAR et D.G. COMB, J.Mol.Biol., 39 (1969) 31.

- 14- M.A.Q. SIDDIQUI et K. HOSOKAWA, Biochem.Biophys.Res. Commun., 36 (1969) 711.
- 15- M. REYNIER et R. MONIER, Bull.Soc.Chim.Biol., 49 (1967) 477.
- 16- M. AUBERT, J.F. SCOTT, M. REYNIER et R. MONIER, Proc. Nat.Acad.Sci., US , 61 (1968) 292.
- 17- B.R. JORDAN et R. MONIER, J.Mol.Biol., 59 (1971)219.
- 18- M. NOMURA, V.A. ERDMANN, Nature, 228 (1970) 744.
- 19- V.A. ERDMANN, S. FAHNESTOCK, K. HIGO and M. NOMURA, Proc.Nat.Acad.Sci., USA, 68 (1971) 2932.
- 20- H. MARUTA, T. TSUCHIYA et D. MIZUNO, J. Mol.Biol., 61 (1971) 123.
- 21- J.J. PENE, E.Jr.KNIGHT et J.E. Jr.DARNELL, J.Mol.Biol., 33 (1968) 609.
- 22- H.W.S. KING et A. GOULD, J.Mol.Biol., 51 (1970) 687.
- 23- J. SY et K.S. Mc.CARTY, Federation Proc., 28 (1969) 2611.
- 24- R.A. WEINBERG et PENMAN, J. Mol.Biol., 38 (1968) 289.
- 25- J.P. WALLER et J. HARRIS, Proc.Nat.Acad.Sci., USA, 47 (1961) 18.
- 26- J.P. WALLER, J.Mol.Biol., 10 (1964) 319.
- 27- E. KALTSCHMIDT, M. DZIONARA, D. DONNER et H.G. WITTMANN, Mol.Gen.Genete., 100 (1967) 364.

- 28- S. FOGEL, P.S. SYMPHERD, Proc.Nat.Acad.Sci., 59 (1968) 1329.
- 29-P.B. MOORE, R.R. TRAUT, H. NOLLER, P. PEARSON et H. DELIUS, J.Mol.Biol., 31 (1968) 441.
- 30- S.J.S. HARDY, C.G. KURLAND, P. VOYNOW, G. MORA, Biochemistry, 8 (1969) 2897.
- 31- G.R. CRAVEN, P. VOYNOW, S.J.S. HARDY et C.G. KURLAND, Biochemistry, 8 (1969) 2906.
- 32- R.R. TRAUT, H. DELIUS, C. ARMAD-ZADEH, T.A. BICKLE, P. PEARSON et A. TISSIERES, Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol., 34 (1969) 25.
- 33- M. NOMURA, Bacteriological Reviews, 34 (1970) 228.
- 34- C.G. KURLAND, D. VOYNOW, S.J.S. HARDY, L. RANDALL et L. LUTTER, Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol., U.S.A., vol. 34 , (1969) 17.
- 35- W. MÖLLER, H. CASTLEMAN, C.P. TERHORST, FEBS Letters, 8 (1970) 192.
- 36- P. VOYNOV, C.G. KURLAND, Biochemistry, 10 (1971) 517.
- 37- J.R. WARNER, J.Biol.Chem., 246 (1971) 447.
- 38- H.W.S. KING, H.J. GOULD et J.J. SHEARMAN, J. Mol.Biol., 61 (1971) 143.
- 39- HUYNH-VAN-TAN, J. DELAUNAY et G. SCHAPIRA, FEBS Letters, 17 (1971) 163.

- 40- P. TRAUB, M. NOMURA, Proc.US.Nat.Acad.Sci., 59 (1968)
777.
- 41- M. NOMURA, P. TRAUB, H. BECHMANN, Nature, 219 (1968)
793.
- 42- M. OZAKI, S. MIZUSHIMA, M. NOMURA, Nature, 222 (1969)
333.
- 43- M. NOMURA, S. MIZUSHIMA, M. OZAKI, P. TRAUB, C.V. LOWRY,
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 34 (1969) 49.
- 44- P. TRAUB, M. NOMURA, J.Mol.Biol., 34 (1968) 575.
- 45- P. TRAUB, M. NOMURA, J.Mol.Biol., 40 (1969) 39.
- 46- P. TRAUB, M. NOMURA, Science, 160 (1968) 198.
- 47- S. MIZUSHIMA, M. NOMURA, Fed.Proc., 29 (1970) 603.
- 48- S. MIZUSHIMA, M. NOMURA, Nature, 226 (1970) 1214.
- 49- F.C. CHAO, Arch.Biochem.Biophys., 70 (1957) 426.
- 50- L.P. GRAVILOVA, D.A. IVANOV, A.S. SPIRIN, J.Mol.Biol.,
16 (1966) 473.
- 51- R.F. GESTELAND, J. Mol.Biol., 18 (1966) 356.
- 52- M.G. HAMILTON, M.L. PETERMANN, J.Biol.Chem., 234
(1959) 441.
- 53- A. TISSIERES, J.D.WATSON, D. SCHLESSINGER, B.R. HOL-
LING-WORTH, J.Mol.Biol., 1 (1959) 221.

- 54- M.G. HAMILTON, M.E. RUTH, Biochemistry, 8 (1969) 851.
- 55- M.L. PETERMANN, A.PAVLOVEC, M.G. HAMILTON, Fed. Proc.,
Fed. Amer.Soc.Exp.Biol., 30 (1971) 1204. Abstr.
- 56- R.F. GESTELAND, J.Mol.Biol., 18 (1966) 356.
- 57- H. LAMFROM, E.R. GLOWACKI, J. Mol.Biol., 5 (1962) 97.
- 58- D.G. COMB, N. SARKAR, J.Mol.Biol., 25 (1967) 317.
- 59- R. Jr. ROSKOSKI, Arch.Biochem.Biophys., 130 (1969) 561.
- 60- A.S. SPIRIN, L.P. GRAVILOVA, "The Ribosome", Spinger-
Verlag, New-York, 1969, p.29.
- 61- R. MISKIN, A. ZAMIR, D. ELSON, Biochem.Biophys.Res.
Commun., 33 (1968) 551.
- 62- A. ZAMIR, R. MISKIN, D. ELSON, FEBS Letters, 3 (1969)
85.
- 63- M.S. KAULENAS, Biochim.Biophys.Acta, 224 (1970) 276.
- 64- T. HULTIN, P.H. NASLUND, M.O. NILSSON, Exptl.Cell.
Res., 55 (1969) 269.
- 65- P.H. NASLUND, T. HULTIN, Biochim.Biophys.Acta, 204
(1970) 237.
- 66- R. MISKIN, A. ZAMIR, D. ELSON, J.Mol.Biol., 54 (1970) 355.

- 67- A. ZAMIR, R. MISKIN, D. ELSON, J.Mol.Biol., 60
(1971) 347.
- 68- A.S. SPIRIN, N.A. KISSELEV, R.S. SHUKULOV, A.A. BOGDANOV, Biokhimiya, 28 (1963) 920.
- 69- I. SUZUKA, A. KAJI, J.Biol. Chem., 243 (1968) 3136.
- 70- P.C. YANG, K. HAMADA, R. SCHWEET, Arch.Biochem.Biophys.,
125 (1968) 506.
- 71- S.A. BONANOU, R.A. COX, B. HIGGINSON, K. KANAGALINGAN ,
Biochem. J., 110 (1968) 87.
- 72- S.A. BONANOÛ, H.R.V. ARNSTEIN, FEBS Letters, 3 (1969)
348.
- 73- T.E. MARTIN, F.S. ROLLESTON, R.B. LOW, I.G. WOOL,
J.Mol.Biol., 43 (1969) 135.
- 74- T.E. MARTIN, I.G. WOOL , J.Mol.Biol., 43 (1969) 151.
- 75- K. TERAOKA, K. OGATA, Biochem.Biophys.Res.Comm.,
38 (1970) 80.
- 76- J. MARCOT-QUEIROZ, P. MONIER, Coll.Soc.Chim.Biol.,
49 (1967) 477.
- 77- M.A.Q. SIDDIQUI, K. HOSOKAWA, Biochem.Biophys.Res.
Commun., 32 (1968) 1.
- 78- P.N. GRAY, R. MONIER, FEBS Letters, 18 (1971) 145.
- 79- G. BLOBEL, Proc.Nat.Acad.Sci., USA, 68 (1971) 1881.
- 80- M. NOMURA, P. TRAUB, Organizational biosynthesis, New-
York, 1966, Academic Press, New-York, 1967, p.459.

- 81- T. STAEBELIN, H. RASKAS, M. MESELSOHN, Organizational Biosynthesis, New-York, 1966, Academic Press, New-York, 1967, p. 443.
- 82- A. ATSMON, P. SPITNIK-ELSON, D. ELSON, J.Mol.Biol., 45 (1969) 125.
- 83- T. ITOH, E. OTAKA, S. OSAWA, J.Mol.Biol., 33 (1968) 109.
- 84- M.I. LERMAN, A.S. SPIRIN, L.P. GAVRILOVA, V.F. GOLOV, J.Mol Biol., 15 (1966) 268.
- 85- P. SPITNIK-ELSON, A. ATSMON, J.Mol.Biol., 45 (1969) 113.
- 86- M.J. LERMAN, Biokhimiya, 2 (1968) 209.
- 87- C. GODIN, J. KRUH, J.C. DREYFUS, Biochim.Biophys.Acta, 182 (1969) 175.
- 88- A.M. REBOUD, M.G. HAMILTON, M.L. PETERMANN, Biochemistry, 8 (1969) 843.
- 89- A.M. REBOUD, J.P. REBOUD, M. ARPIN, C. WITTMANN, Biochim.Biophys.Acta, 232 (1971) 171.
- 90- J.C.S. CLEGG, H.R.V. ARNSTEIN, European J.Biochem., 13 (1970) 149.
- 91- S.S. COHEN, J. LICHTENSTEIN, J.Biol.Chem., 235 (1960) 2112.
- 92- P.F. SPAHR, J.Mol.Biol., 4 (1962) 395.

- 93- W. ZILLIG, W. KRONE, M. ALBERG, Z.Physiol.Chem., 317
(1959) 131.
- 94- S. AMOTZ, Israel, J.Med.Sci., 1 (1965) 486.
- 95- P.J. KELLER, E. COHEN, R.D. WADE, J.Biol.Chem., 239
(1964) 3292.
- 96- P. SIEKEVITZ, G.E. PALADE, J.Cell.Biol., 13 (1962)
217.
- 97- A. RAINA, T. TELARANTA, Biochim.Biophys.Acta, 138
(1967) 200.
- 98- K. MOLDAVE, L. SKOGERSON, Methods in Enzymology, Vol.
XII part.A, (1967) 478.
- 99- T.E. MARTIN, I.G. WOOL, Proc.Nat.Acad.Sci., Wash.,
60 (1968) 569.
- 100- G.R. LAWFORD, Biochem.Biophys.Res.Comm., 37
(1969) 143.
- 101- J.P. REBOUD, European J.Biochem., 10 (1969) 330.
- 102- P. COHN, P. SIMSON, Biochem.J., 88 (1963) 206.
- 103- J.B. CURRY, R.T. HERSH, Biochem.Biophys.Res.Comm.,
6(1962) 415.
- 104- R.A. REISFELD, U.J. LEWIS, D.E. WILLIAMS, Nature,
195 (1962) 281.
- 105- M.L. PETERMANN, A. PAVLOVEC, J.Biol.Chem., 238 (1963)
3717.
- 106- R.F. GESTELAND, J.Mol.Biol., 18 (1966) 356.
- 107- R. ROSSET, Thèse de Doctorat ès Sciences Physiques,
Marseille, 1965.

- 108 - E.G. RICHARDS, J.A. COLL et W.B. GRATZER, Biochemistry, 5 (1966) 988.
- 109 - U.E. LOENING, Biochem.J., 102 (1967) 251.
- 110 - M. ARPIN, A.M. REBOUD, J.P. REBOUD, Biochim.Biophys. Acta, sous presse.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	7
-------------------	---

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I : STRUCTURE DES RIBOSOMES

1-1. Tableau récapitulatif des principales caractéristiques des ribosomes de bactéries et de mammifères.....	11
1-2. Les RNA ribosomiques : propriétés et rôle.....	11
1-2-1. Chez les bactéries.....	11
1-2-2. Chez les mammifères.....	14
1-3. Les protéines ribosomiques.....	15
1-3-1. Chez <u>E.coli</u>	15
1-3-2. Chez les mammifères.....	16
1-4. Organisation des ribosomes.....	16

CHAPITRE II : ACTION DES SELS SUR LES RIBOSOMES

2-1. Introduction.....	18
2-2. Rôle des cations bivalents.....	18
2-2-1. Rôle du magnésium.....	18
2-2-2. Effet des autres cations bivalents.	19
2-2-2-1. Sur l'association des sous-unités ribosomiques.....	19
2-2-2-2. Sur l'activité des sous-unités de foie de rat.....	20
2-3. Rôle des cations monovalents.....	20
2-3-1. Rôle des cations monovalents à faible concentration.....	20

2-3-2. Effet des monocations à concentration élevée sur les ribosomes.....	21
2-3-2-1. Sur l'activité des sous-unités.....	21
2-3-2-2. Sur l'extraction des RNA de faible poids moléculaire.....	23
2-3-2-3. Sur la dissociation des protéines...	24
a) des ribosomes d' <u>E.coli</u>	24
b) des ribosomes de Mammifères...	25
2-4. Rôle des polyamines.....	25

DEUXIEME PARTIE

TECHNIQUES

I - Préparation des ribosomes de Mammifères.....	27
1-1. Préparation des microsomes.....	27
1-2. Préparation des ribosomes à partir des microsomes	27
1-3. Lavage des ribosomes.....	28
II - Traitement des ribosomes par les sels.....	28
2-1. Principe de la méthode.....	28
2-2. Méthode expérimentale.....	29
III - Séparation des sous-unités.....	29
3-1. Méthode expérimentale.....	30
3-2. Traitement des sous-unités.....	30
IV - Technique de mesure de l'activité des sous-unités obtenues après traitement des ribosomes par les sels.....	31
4-1. Principe de la méthode.....	31
4-2. Technique utilisée.....	31
4-3. Diagramme d'activité des ribosomes.....	33
4-3-1. Ribosomes normaux.....	33
4-3-2. Ribosomes traités par les différents sels monocationiques.....	33

V - Méthode d'extraction des protéines.....	34
VI - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines ribosomiques.....	35
VII - Traitement par le bleu procion.....	37
VIII - Obtention des RNA ribosomiques.....	38
8-1. Extraction des RNA par le SDS.....	38
8-2. Extraction des RNA par le phénol.....	38
8-3. Précipitation des RNA.....	39
IX - Filtration des RNA sur gel de Séphadex.....	40
X - Séparation des RNA par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	41

TROISIEME PARTIE

RESULTATS

CHAPITRE I : MODIFICATIONS DE LA CONFORMATION DES GROSSES SOUS-UNITES RIBOSOMIQUES DE FOIE SOUS L'ACTION DES DIVERS CATIONS.

1-1. Principe de la méthode.....	44
1-2. Comparaison des protéines des sous-unités 60S préparées avec différents sels.....	44
1-3. Comparaison des protéines restant après traitement des sous-unités par le bleu pro- cion.....	46
1-3-1. Diagramme d'électrophorèse des protéines des sous-unités 60S après action du bleu procion.....	46
1-3-2. Dosage des protéines des sous-unités 60S soumises au bleu procion.....	46
1-4. Discussion.....	47

CHAPITRE II : EFFET DES CATIONS MONOVALENTS SUR LA TENEUR
EN RNA DE FAIBLE POIDS MOLECULAIRE DES SOUS-
UNITES

2-1. Analyse des RNA de faible poids moléculaire.....	48
2-1-1. Diagramme de filtration sur Séphadex G 100.....	48
2-1-2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des rRNA de faible poids moléculaire.....	49
2-1-3. Nature du RNA contenu dans le pic II.	49
2-2. Etude quantitative de l'action des sels sur les RNA de faible poids moléculaire..	50
2-3. Discussion.....	51
CONCLUSIONS GENERALES.....	53
BIBLIOGRAPHIE	57
TABLE DES MATIERES.....	66

Vu
Les Membres du Jury,

D. GAUTHERON
J. DAILLIE
J.P. REBOUD

Vu et approuvé
Le Directeur de l'U.E.R. de Chimie
et Biochimie

D. GAUTHERON

Vu et accordé le permis d'imprimer
LYON, le 20 Juin 1972

Le Président de l'Université Claude
Bernard

J. BOLDIN

